

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización citogenética de dos poblaciones de  
*Triatoma infestans* (Klug, 1834) del sur del Perú**

**TESIS**

**Para optar el Grado Académico de Bachiller en Ciencias Biológicas**

**AUTOR**

**Yenny del Rosario Guevara Venegas**

**Lima – Perú**

**2010**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Caracterización citogenética de dos poblaciones de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) del sur del Perú

Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Ciencias  
Biológicas

Srta. Yenny del Rosario Guevara Venegas

Asesora: Mg. Olga Bracamonte Guevara

Lima – Perú

2010

## RESUMEN

En la actualidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008, se calcula que existe entre 16 a 18 millones de personas a nivel mundial afectadas por el parásito *Trypanosoma cruzi*, cuyo vector principal es *Triatoma infestans*.

En nuestro país, la enfermedad se presenta en forma endémica en la región sur afectando principalmente a los departamentos costeros de Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna. La falta de conocimiento del vector y la mala implementación de programas para su control, han dado como resultado altos índices de mortandad en la población y la adaptación cada vez mejor del insecto al ambiente doméstico y por ende al ser humano.

En el presente trabajo, utilizando individuos nativos de *Triatoma infestans* pertenecientes a las localidades de Santa Rita de Sigüas y Nazca, se confirmó el número cromosómico, y aplicando la técnica del bandeo "C", utilizada para identificar los bloques de heterocromatina y usarlos como marcadores cromosómicos diferenciando el genoma andino del no andino en las poblaciones en estudio.

Mediante la posición de los bloques heterocromáticos se han detectado polimorfismos cromosómicos en número y posición a nivel de los autosomas de los individuos intra e interpoblacionales, y se ha podido determinar el tipo de genoma (andino o no andino) para las poblaciones estudiadas. Por primera vez se evidencia la presencia de población con genoma del grupo andino (población de Ica) que aparece a baja altitud.

Palabras clave: Bando C, Santa Rita de Sigüas, Nazca, polimorfismos cromosómicos, bloques de heterocromatina.

## Abstract

Currently, according to the World Health Organization (WHO) 2008, it is estimated that between 16 and 18 million people worldwide are affected by the parasite *Trypanosoma cruzi*, which main vector is *Triatoma infestans*. The path vector of disease transmission is the main cause of the high levels of disease and mortality.

In our country, the disease occurs endemically in the southern region, mainly affecting the coastal departments of Ica, Arequipa, Moquegua and Tacna. The lack of knowledge of the vector and poor implementation of programs for its control, result in high mortality rates in the population and the best ever adaptation of the insect to the home environment, consequently to humans.

In the present work, using native individuals of *Triatoma infestans* from endemic areas for Chagas disease, belonging to the villages of Santa Rita de Siguas and Nazca, and applying cytogenetic techniques such as squash technique it was confirmed the chromosome number.

The C-banding technique was used to determinate heterochromatic zones along the chromosome fiber, which allowed the identification of heterochromatin blocks so that they could be used as chromosomal markers in order to be able to differentiate the Andean genome from the no- Andean one in the populations studied.

By the position of heterochromatic blocks, chromosomal polymorphisms were detected at the number and position of the autosomes of individuals within and between populations, and the type of genome has been detected (Andean or no-Andean) for the populations studied. It is shown, for the first time, the presence of population with the Andean group genome (population of Ica) that appears at low altitude.

Key words: C banding, Santa Rita de Siguas, Nazca, chromosomal polymorphisms, heterochromatin blocks.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, que participaron en mi formación académica e investigadora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYTEC, por el apoyo económico brindado para el viaje a la ciudad de Montevideo.

Al Consejo Superior de Investigaciones, CSI, de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos, por su reconocimiento económico en la subvención, para el desarrollo de la presente tesis, como parte del concurso de Tesis de pregrado 2009.

Al Dr. Francisco Panzera, de la Universidad de Ciencias –Montevideo-Uruguay, por brindarme el asesoramiento práctico y teórico en el laboratorio de Genética de Chagas.

Al Dr. Daniel Frias Lasserre del Instituto de Entomología José Herrera de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación-Santiago-Chile, por su constante apoyo, asesoramiento y por su amistad brindada durante todo este tiempo de investigación.

Al Dr. Misael Guevara, jefe del laboratorio de Citogenética General de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos, por su apoyo y colaboración académica para el desarrollo de la presente tesis.

A la Mg. Olga Bracamonte del laboratorio de Citogenética General Universidad Nacional Mayor de san Marcos, por el asesoramiento de la presente tesis.

Al Biólogo, Jaime Vásquez, del laboratorio de Genética Evolutiva de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos, por su apoyo incondicional, asesoramiento, amistad brindada y valiosos consejos durante todo este tiempo de investigación.

Al Biólogo Fernando Málaga, jefe del Programa de vigilancia y Control vectorial a través de la OPS y el estado peruano MINSA, Arequipa-Perú, por su apoyo en la colecta de las muestras realizadas en la localidad de Santa Rita de Sigwas.

A la Sra. Guadalupe Huamán, del Hospital Regional Nazca, por su ayuda en la colecta de muestras en la zona de Los Jardines, ciudad de Nazca.

A mis amigos de promoción, en especial Gisela, Avy, Isabel y Malena, por su constante apoyo hasta el día de hoy, y a mis amigos de siempre, gracias por su amistad brindada.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser el autor de una fé que me acompaña siempre.

A mi amada familia; mis padres Clodoaldo Pedro y Elvira Teresa, mi hermano Gerardo Víctor por su invaluable apoyo, sustento a mi vida y por ser parte de mi desarrollo y logros personales.

## INDICE GENERAL

	Páginas
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
INDICE GENERAL	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1.-Importancia del problema	1
1.2.-Justificación	3
1.3.-Objetivos	4
1.3.1.-Objetivo General	4
1.3.2.-Objetivos Específicos	4
II. ANTECEDENTES	5
2.1.- <i>Triatoma infestans</i>	6
2.1.1.-Clasificación taxonómica	6
2.1.2.-Distribucion geográfica	6
2.1.3.-Características morfológicas	7
2.1.4.-Ciclo de vida	8



2.1.5.-Citogenetica de los Triatominos	8
2.1.6.-Distribución de la heterocromatina	9
2.1.7.-Bandas “C”	11
2.1.8.-Cromocentro	12
2.1.9.- Cromosomas holocéntricos	12
2.1.10.- El genoma de los triatominos	12
2.1.11.-Dispersion de <i>Triatoma infestans</i>	13
2.1.12.- Dispersión andina	14
2.1.13.- Dispersión no-andina	15
2.1.14.- Hipótesis adaptativa	15
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	 16
3.1.- Material	16
3.2.-Equipo	17
3.3.-Lugar de ejecución del trabajo	17
3.4.- Material biológico	17
3.4.1.-Recolección	17
3.4.2.-Método	18
3.4.3.-Preparación de material	19
3.4.4.-Preparacion de láminas	19

<b>3.4.5.-Aplicación técnica de aplastado</b>	<b>19</b>
<b>3.4.6.-Aplicación de técnica de bandeo “C”</b>	<b>20</b>
<b>3.4.7.-Coloración</b>	<b>21</b>
<b>3.4.8.-Montaje</b>	<b>21</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>4.1.- Población de Nazca</b>	<b>22</b>
<b>4.2.-Población de Santa Rita de Sigvas</b>	<b>26</b>
<b>V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>38</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>39</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>43</b>
<b>X. ADENDA</b>	<b>69</b>

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

*Triatoma infestans* (Klug, 1834) comúnmente conocido como “chirimacha”, por su capacidad de adaptación al ambiente peri - domiciliario y domiciliario se ha constituido como el más importante agente transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas.

Se calcula que en todo el mundo hay entre 16 y 18 millones de personas infectadas por el parásito, de las cuales cada año mueren aproximadamente 50000. Debido a la migración, el número de casos ha aumentado en Europa y los Estados Unidos de América, este hecho plantea riesgos adicionales de transmisión a través de las transfusiones de sangre y de los trasplantes de órganos (Organización Mundial de la Salud, noviembre 2008).

Se estima que alrededor de 650000 a 680000 personas, pueden ser infectadas por *T. cruzi* en el Perú, con 5 a 6,8 millones de personas viviendo en riesgo (Chávez, 2006).

El mecanismo más importante de transmisión de *T. cruzi* hacia los humanos y otros mamíferos es a través de las heces de triatominos infectados.

A los triatominos los podemos encontrar en todos los países Sudamericanos, Centroamérica, México, Norteamérica, Asia, a excepción de *T. rubrofasciata*, ninguno se ha encontrado en África (Galvao, C. 2003).

En vista de la importancia clínica que representa esta enfermedad y en ausencia de una vacuna adecuada, debido a la complejidad antigénica de *T. cruzi*, la lucha se basa principalmente en el control del vector.

Se ha recurrido a diversos tipos de control vectorial, como el uso de piretroides, resultando exitosos para algunos países como Chile, Uruguay y Brasil.

Sin embargo no todos los triatominos responden de igual manera a estos insecticidas, recientemente se detectó poblaciones de *T. infestans* resistentes a insecticidas piretroides en el norte de Argentina y en el centro y sur de Bolivia (Toloza, A. 2008).

En Argentina el uso continuo de piretroides para controlar las poblaciones de *T. infestans* ha constituido una fuerte presión selectiva que condujo a la aparición de focos de insectos resistentes a estos insecticidas (Alzogaray, 2003), también se ha reportado resistencia a piretroides en Venezuela.

En nuestro país, la macro-región sur del Perú, conformada por los departamentos de Arequipa, Moquegua, Tacna, Ica, Ayacucho y Apurímac, es considerada la principal zona chagásica, con presencia de un alto índice de triatominos vectores. En esta macro-región, *Triatoma infestans* comúnmente conocida como “chirimacha” (deriva de las voces quechuas que significan “borracho por el frío”), es el vector exclusivo y se caracteriza por ser enteramente domiciliario. Este insecto se encuentra disperso en el 9.0% de la superficie nacional (119 228.75 Km<sup>2</sup>); se estima que 160000 viviendas se encuentran infestadas y alrededor de 600000 habitantes las habitan (2.0% de la población nacional) (Quintana, 2009).

En Arequipa, a partir del año 2003, se viene trabajando en forma organizada y sistemática en el programa denominado Programa de vigilancia y Control vectorial, con el apoyo de una agencia canadiense a través de la OPS y el estado peruano a través del MINSA, en las localidades de Santa Rita de Sigüas, Santa Isabel de Sigüas, La Joya y Vitor.

En el valle de Vitor se han reportado datos de resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Yon et al., 2004).

Aunque es prioritario controlar el crecimiento de las poblaciones de *Triatoma infestans*, también es indispensable conocer las características biológicas de este organismo, entre las que podemos citar las cromosómicas para poder determinar cuál es el componente genético asociado a la resistencia, incluyendo su expresión y su mecanismo de herencia.

Es por estas razones que se ha considerado necesario conocer al agente vector, aplicando las técnicas tradicionales de la citogenética para identificar la cantidad y la ubicación de los bloques heterocromáticos en las poblaciones en estudio.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

Debido a su gran importancia epidemiológica, *Triatoma infestans* ha sido estudiada desde el punto de vista taxonómico, epidemiológico, bioquímico, citogenético y últimamente molecular, siendo los aportes de la genética una de las principales herramientas que están permitiendo dilucidar sus rutas y mecanismos de dispersión (Panzera et al., 2007).

En la actualidad los triatominos son objeto de extensos análisis genéticos que complementan en gran medida la actual clasificación basada casi exclusivamente en caracteres morfológicos.

Desde el punto de vista cromosómico *T. infestans* presenta el número diploide ( $2n$ ), 22 cromosomas, compuesto por 20 autosomas más los cromosomas XY en el macho y XX en la hembra (Pérez et al., 2003).

Recientemente se identificaron individuos clasificados como “andinos” (de localidades de Perú y Bolivia) y “no andinos” (poblaciones de Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay y el Chaco boliviano). El grupo “andino” posee entre 14 y 20 cromosomas heterocromáticos y un 50% más de heterocromatina que el grupo “no andino” (el cual solo posee de 4 a 7 cromosomas heterocromáticos), siendo esta variación heterocromática la principal causa de la gran diferencia en el tamaño genómico existente entre ambos grupos (diferencia superior al 30%) (Panzera et al., 2004).

Será necesario investigar si existe alguna asociación entre la cantidad de heterocromatina presente en los cromosomas de estos insectos y otros parámetros como nicho ecológico, distribución geográfica, características fenotípicas y tasa de desarrollo. Algunos de estos parámetros podrían estar relacionados con la capacidad de invasión y colonización de viviendas humanas, por lo que pueden incidir en su importancia como vectores de la enfermedad de Chagas.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer el número cromosómico de la especie *Triatoma infestans*, "chirimacha" de las poblaciones pertenecientes a los departamentos de Ica y Arequipa, lo que nos permitirá tener un registro de las cepas de las poblaciones de Perú.

### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar, mediante la técnica de bandeo "C", la presencia de genoma no andino en individuos de *T. infestans* nativos de zonas localizadas a baja altitud como en el caso del departamento de Ica (Nazca 588 msnm). Así también el genoma andino en individuos de mediana altitud del departamento de Arequipa, (Santa Rita de Sigwas 1268 msnm).

2. - Establecer los mecanismos y rutas de dispersión de *Triatoma infestans*.

## II. ANTECEDENTES

En 1909, Payne realizó la primera descripción del número de cromosomas de los Triatominae, posteriormente el grupo de Giorgio Schreiber en Minas Gerais (Brasil) continuó las descripciones desde 1950 hasta principios de la década del 70 (Dujardin et al., 2002).

Ueshima en 1979 reporta los números cromosómicos de 29 especies de Triatominae, para el 2002 este número se había incrementado a 70 especies. En este grupo, los cromosomas sexuales múltiples son frecuentes probablemente por la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas (Citado en Dujardin et al., 2002).

En los últimos años el estudio del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis del macho y la aplicación de técnicas de bandeo cromosómico han demostrado ser útiles para el análisis detallado de esta subfamilia (Pérez et al., 1992; 2002) y (Panzera et al., 1995; 1997; 2000) (Citado en Dujardin et al., 2002).

Para el año 2002, se detectó que todas las especies de Triatominae analizadas presentaban cromosoma Y heterocromatizado. Muchas de las especies también presentaban heterocromatina "C" en sus autosomas y sólo unas pocas especies sobre el cromosoma X (Citado en Dujardin et al., 2002).

## **2.1     *Triatoma infestans*.**

### **2.1.1. Clasificación taxonómica**

Reino:           ANIMALIA

Phyllum:       ARTHROPODA

Clase:           HEXAPODA

Orden:          HEMÍPTERA

Sub- Orden:    HETERÓPTERA



Familia: REDUVIIDAE

Sub familia: Triatominae

Tribu: Triatomini (Jeannel, 1919)

Género: *Triatoma* (Laporte, 1832)

Especie: *Triatoma infestans* (Klug, 1834)

### **2.1.2. Distribución geográfica**

En Sudamérica los encontramos en :Argentina (Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, San Luis, San Juan, Santiago del Estero, Santa Fe, Tucumán); Bolivia; Brazil (Alagoas, Bahía, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Sao Paulo, Santa Catarina); Chile; Ecuador; Paraguay; Perú; Uruguay (Lent,H y Wygodzinsky P; 1979).

En la macro región sur, específicamente el departamento de Arequipa se ha registrado infestación de *Triatoma infestans* en todos los distritos (figura 1 adenda).

### **2.1.3 Características morfológicas**

*Triatoma infestans*, es un insecto caracterizado por ser de color negro o marrón oscuro, como los ejemplares de Nazca y Santa Rita de Sigvas, con márgenes amarillos en el dorso, patas y conexivum, pilosidad corta y esparcida.

El macho alcanza una longitud de 21-26 mm. con un pronoto de 5.5-6.5 mm. mientras que la hembra tiene una longitud de 26-29 mm. con una pronoto de 6.0-6.5 mm. El

abdomen del macho fluctúa entre 8-10 mm. y en la hembra de 8.5 a 10.0 mm. generalmente aplanado.

Presentan cabeza alargada, cilíndrica o cónica, y un aparato bucal chupador picador, la trompa está compuesta por tres segmentos, la cual se encuentra doblada bajo la cabeza durante el reposo y se extiende hacia delante cuando este insecto se alimenta.

Presenta ojos compuestos, grandes, redondeados y salientes, un par de antenas largas, finas, formadas por cuatro segmentos. El tórax es duro y bien queratinizado, de donde nacen dos pares de alas bien desarrolladas que cubren todo el abdomen, con manchas características de importancia taxonómica (Imagen 1a, 1b).

#### **2.1.4. Ciclo de Vida**

Los hemípteros, presentan metamorfosis gradual con tres estadios de desarrollo: (huevo-ninfa-adulto). Tanto los adultos como las ninfas utilizan las mismas fuentes de alimento, siendo por este motivo denominados paurometabólicos.

El ayuno prolongado suspende su desarrollo, cuando consiguen una nueva fuente alimenticia se generan mayores oportunidades de supervivencia (comunicación verbal del asesor Francisco Panzera) (figura 2 adenda).

#### **2.1.5. Citogenética de los Triatominos**

La primera descripción del número de cromosomas de los Triatominae fue realizada en *Triatoma sanguisuga* (complejo *lecticularia*, grupo *Protracta*) Payne (1909), posteriormente ampliada por Giorgio Schreiber en Minas Gerais (Brasil) desde 1950 (Schreiber & Pellegrino 1950) (Schreiber et al., 1974a) (Citado en Dujardin et al., 2002).

El número diploide en los machos varía entre  $2n=21$  y  $2n=25$ , siendo el más frecuente  $2n=22$  cromosomas. La variación en el número cromosómico se debe

fundamentalmente al sistema de determinación cromosómica del sexo que presentan los triatominos, así tenemos que en los machos se han descrito tres sistemas ó mecanismos sexuales diferentes : XY,  $X_1X_2Y$  y  $X_1X_2X_3Y$  un cuarto mecanismo ( $X_1X_2Y_1Y_2$ ) que está pendiente de confirmación en el género *Mepraia* (Panzera et al., 2007) (figura 3 adenda).

Los organismos diploides presentan en sus células dos conjuntos cromosómicos, los autosomas y los cromosomas sexuales. En lo referente a los autosomas (A), los Triatominae presentan un número muy homogéneo. Solamente tres de las 70 especies analizadas se alejan del valor más común, y supuestamente ancestral, de 20 autosomas (Ueshima1966). *Pastrongylus megistus* y *Triatoma nítida* tienen 18 autosomas, y *T. rubrofasciata* tiene 22 (Citado en Dujardin et al., 2002).

#### **2.1.6. Distribución de la heterocromatina en los cromosomas de *Triatoma infestans***

La heterocromatina se distribuye en los cromosomas autosómicos y sexuales, su presencia en cuanto a número de cromosomas heterocormáticos se establece de acuerdo si la población es andina ó no andina. En las poblaciones de Uruguay, cuyo cariotipo de *T. infestans* es  $2n=22$  descrito por Schreiber y Pellegrino (1950) y Barth (1956) puntualizaron que tres largos pares autosómicos de esta especie forman un largo cromocentro heteropicnótico durante la profase meiótica. Este cromocentro se forma sólo por la unión de los bloques heterocromáticos de los tres pares autosómicos más largos y los cromosomas sexuales, Solari (1979). Los dos pares largos contienen dos bloques de heterocromatina localizados cerca al final del cromosoma, mientras el tercer par exhibe un solo bloque simple terminal (Citado en Panzera et al., 1992).

El cromosoma Y, muestra un largo bloque C- positivo (banda "C"), mientras el cromosoma X carece de éste (ésto para las poblaciones no-andinas). El particular diseño de banda "C" fue confirmado por Mello, Recco-Pimentel, Solari y Agopian en 1987 (Citado en Panzera et al., 1992).

El tamaño del bloque heterocromático se constituye en una variable en la diferenciación intraespecífica a considerarse en los Triatominae. Se ha encontrado que en varias especies de *Rhodnius* los bloques son puntiformes, mientras que en *Triatoma nítida* el bloque representa más del 50% del cromosoma (Citado en Dujardin et al, 2002).

La cantidad de heterocromatina puede variar entre 0 y 45% del total del complemento autosómico (Panzera et al., 1994) (Citado en Dujardin et al., 2002) Puede encontrarse en un par cromosómico, 2 pares, 3 pares ó en los 10 pares de autosomas. En general se localiza en los extremos cromosómicos, pudiendo estar en uno solo ó en ambos extremos del cromosoma (Citado en Dujardin et al., 2002).

Se ha demostrado que *Triatoma infestans* tiene bloques heterocromáticos relativamente grandes en algunos de sus pares cromosómicos que representan, dependiendo de la población analizada, entre el 25 y 45 % del complemento cromosómico (Citado en Panzera et al., 2007).

Se han observado variaciones de heterocromatina dentro de esta misma especie, así tenemos que la primera referencia constatada del polimorfismo cromosómico intraespecífico, manifestado en el tamaño de bandas en poblaciones naturales fue observado en *T. infestans* en Uruguay (Dujardin et al., 2002)(figura 4 adenda).

Atendiendo a la distribución de los bloques a lo largo de los cromosomas, estos se han podido clasificar como de tipo A, B y C, con sus variantes respectivas.

Los cromosomas tipo A, se caracterizan por presentar una sola banda heterocromática en uno de los extremos del cromosoma. Los cromosomas tipo B, presentan dos bandas heterocromáticas una en cada extremo del cromosoma. Los cromosomas de tipo C carecen de bandas heterocromáticas Y los cromosomas sexuales se caracterizan por presentar una heterocromatización diferencial.

Variante A: Solo uno de los extremos cromosómicos posee un bloque C- heterocromático. El otro extremo puede ser totalmente eucromático ( $A_1$ ), puede presentar un pequeño punto ( $A_2$ ) ó una banda delgada ( $A_3$ ).

Variante B: Los dos extremos cromosómicos presentan bloques C- heterocromáticos. Estos bloques pueden ser ambos simples ( $B_1$ ), uno simple y el otro doble ( $B_2$ ) ó los dos dobles ( $B_3$ ).

Variante C: En un solo extremo cromosómico se observa un pequeño punto C- heterocromático (figura 5 adenda).

#### **2.1.7. Bandas “C”**

Las regiones heterocromáticas de los cromosomas se detectan con coloraciones apropiadas para este fin, tal es el caso de las bandas “C” que permite identificar las regiones heteropicnóticas positivas detectadas durante la profase meiótica. Las regiones que muestran banda “C” son llamadas heterocromáticas “C” positivas y están constituidas principalmente por ADN altamente repetido (Dujardin et al., 2002) (figura 6 adenda).

Las diferencias en los patrones de bandas “C”, involucran el número de autosomas afectados, la localización sobre el autosoma (en un extremo ó en los dos) y el tamaño de los bloques “C” positivos (Panzera et al., 1992; Panzera et al., 1994; Pérez et al., 1997).

Aunque el número cromosómico en los triatomíneos se encuentra bastante conservado, con la aplicación de la técnica de bandeo "C", y el análisis detallado del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis del macho, se ha podido identificar una extensa variabilidad de las regiones heterocromáticas (a nivel de su cantidad, distribución a lo largo del cromosoma, naturaleza y comportamiento de la heterocromatina) tanto a nivel inter como intraespecífico. Es así, que se ha logrado detectar una extensa variabilidad cromosómica intrapoblacional en *T. infestans* (Panzera et al., 1992; 2004).

Las prometafases mitóticas de distintas especies de la subfamilia *Triatominae*, permiten detectar diferencias poblacionales y entre especies (número, tamaño, localización de regiones heterocromáticas) (figura 7 adenda).

La presencia de bandas intersticiales en los cromosomas autosómicos, por ejemplo en el caso de *Triatoma patagónica*, se menciona excepcional y se constituyó en una característica específica y diferencial de especie. (Dujardin et al., 2002).

#### **2.1.8. Cromocentro**

En *Triatoma infestans*, Panzera et al., (1992) manifestaron que Solari en 1979 demostró que el cromocentro está formado solo por los bloques de los tres pares autosómicos más largos y los cromosomas sexuales, esto para las poblaciones de Uruguay.

En la especie *Mepraia spinolai*, durante la profase I de la meiosis es posible distinguir un cromocentro constituido por los bloques heterocromáticos de los cromosomas sexuales y los telómeros C- positivos de los autosomas, sin embargo en *Mepraia gajardoi* no se detectó un cromocentro, ambas poblaciones son de Chile y pertenecen a la familia Reduviidae (Frías, L.D.2004).

El comportamiento diferencial durante profase meiótica I del macho, formación de cromocentro en diferentes especies de triatominos, se constituye en un carácter diagnóstico (Panzera et al., 1992) (figura 8 A, B, C, D, E, F).

#### **2.1.9. Cromosomas holocéntricos**

Los insectos del orden Hemíptera, así como otros grupos taxonómicos, tales como Nemátoda, Lepidóptera y algunos arácnidos, poseen cromosomas particulares denominados “holocéntricos” (cromosomas con centrómero no localizado o difuso). Estos cromosomas presentan particularidades, durante la división meiótica relacionada directamente con la adhesión a las fibras del huso (Citado en Dujardin et al., 2002).

#### **2.1.10. El genoma de los triatominos**

Al igual que en muchos otros organismos eucariotas, las diferencias en el tamaño genómico entre poblaciones de una misma especie ó entre especies evolutivamente cercanas, probablemente se deban a cambios en el número de secuencias repetidas presentes en la heterocromatina (Panzera et al., 2007).

La correlación entre heterocromatina y tamaño genómico explica la mayor parte de las diferencias observadas entre distintas poblaciones de una misma especie, en este caso las diferencias en la cantidad de ADN entre las poblaciones andinas y no-andinas de *T. infestans* están fuertemente asociadas con las variaciones en la cantidad de heterocromatina (Panzera et al., 2004).

#### **2.1.11. Dispersión de *T. infestans***

Reconstrucciones históricas sobre las migraciones humanas indican que la dispersión de las formas domésticas de *T. infestans* ocurrió durante los últimos 100 ó 150 años, desde el sur de Bolivia hacia el resto de su distribución geográfica. A comienzos del

siglo 20, esta especie invadió Uruguay, Perú y Brasil, alcanzando el estado de Bahía a partir de 1970 y en el norte de Brasil (Panzera et al., 2007).

Los primeros estudios genéticos que comenzaron a esclarecer la estructura poblacional de esta especie se realizaron mediante la aplicación de electroforesis de isoenzimas (Dujardin et al., 1987). Estos primeros estudios sugirieron que el proceso de dispersión de individuos de Bolivia hacia Perú fue reciente (Citado en Panzera et al., 2007)

La dispersión de *T. infestans* al parecer sigue un modelo de aislamiento por distancia, en el cual esta especie se dispersó activamente por vuelo entre localidades cercanas, pero a grandes distancias, el transporte pasivo a través del hombre jugó un papel esencial (Citado en Panzera et al., 2007).

En análisis citogenéticos (aplicando la técnica de bandeo "C") realizados en *T. infestans* en algunos países de Sudamérica se identificaron dos grupos, analizándolos desde el punto de vista cromosómico que se mostraron alopátricos, claramente diferenciados, denominados "andino" (individuos de localidades andinas de Bolivia y Perú) y "no-andino" (poblaciones de Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay y Chaco boliviano).

El grupo "andino" posee entre 14 y 20 cromosomas heterocromáticos y un 50 % más de heterocromatina que el grupo "no-andino" (el cual sólo posee de 4 a 7 cromosomas heterocromáticos). Esta variación en la cantidad de heterocromatina es la principal causa de la gran diferencia en el tamaño genómico existente entre ambos grupos (diferencia superior al 30%).



Recientemente (2008), el grupo de investigación de Panzera halló un tercer grupo cromosómico denominado “Intermedio”, caracterizado por tener entre 7 y 11 cromosomas heterocromáticos y los sexuales iguales al grupo no-andino localizado en un área bastante restringida y delimitada geográficamente ubicada entre el extremo norte de Argentina (Salvador Mazza, Provincia de Salta) y el sur de Bolivia (Departamento de Tarija).

A: Grupo no Andino: Entre 4-7 autosomas heterocromáticos con el cromosoma Y heterocromático y el X eucromático.

B: Grupo Intermedio: Entre 7 y 11 cromosomas heterocromáticos y los sexuales iguales que el grupo no Andino.

C: Grupo Andino: Entre 14 y 20 autosomas heterocromáticos, así como ambos sexuales con heterocromatina (figura 9 adenda).

#### **2.1.12. Dispersión Andina**

Durante la dispersión de *T. infestans*, ya doméstico, desde los valles andinos de Bolivia hacia otras regiones de Bolivia y Perú, esta especie mantuvo inalterado su tamaño genómico (Dujardin & Tibayrenc, 1985b; Dujardin et al. 1998). Las poblaciones de *T. infestans* son panmícticas pero fuertemente estructuradas entre localidades, conformando un modelo de aislamiento por distancia (Dujardin et al., 1998) (Citado en Panzera et al. 2007).

#### **2.1.13. Dispersión no Andina**

El segundo evento denominado “no andino”, implicó la dispersión de los insectos desde el norte de Argentina (Chaco húmedo) hacia otras regiones de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. En este proceso los insectos experimentaron una sustancial pérdida de heterocromatina, y por consiguiente una reducción significativa en su tamaño genómico (reducción del 30 al 40% de ADN en comparación con las poblaciones andinas de Bolivia y Perú) (Citado en Panzera et al., 2007).

Panzera et al., (2004) plantearon la hipótesis de que las poblaciones no andinas se originaron a partir de unos pocos individuos fundadores que eventualmente perdieron su ADN por deriva genética y se dispersaron hacia el sur.

La reducción drástica de ADN implicó además una reorganización muy importante del genoma, generándose nuevas y numerosas combinaciones génicas que se tradujeron en una gran variabilidad de patrones cromosómicos en este segundo centro de dispersión (Chaco húmedo-Argentina) (figura 10 adenda).

#### **2.1.14. Hipótesis Adaptativa**

Según la hipótesis sugerida por Panzera et al., (2004), la drástica reducción del genoma que experimentaron los insectos del grupo no-Andino resultó en nuevas combinaciones génicas que favorecieron su adaptabilidad a sobrevivir y reproducirse en distintos ambientes, los insectos pertenecientes al grupo andino estarían mejor adaptados y colonizarían con mayor éxito ambientes de gran altitud, en cambio los no-andinos estarían mejor adaptados a ambientes de baja altura.

Los individuos andinos, de mayor genoma, conservaron la capacidad de colonizar tanto el ambiente doméstico como el silvestre, pero su capacidad de dispersión sería menor en comparación con la observada por los insectos no-andinos, los cuales experimentaron una rápida y exitosa adaptación al ambiente doméstico, pero como

contraparte disminuyeron notoriamente su capacidad de retornar al ambiente silvestre (Panzera et al., 2004).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

- Pinzas punta fina
- Ependorf
- Etiquetas
- Plumón marcador
- Grafito
- Guantes quirúrgicos
- Frascos de plástico pequeños con tapa
- Láminas porta objetos con borde para escribir con grafito
- Láminas porta objetos cavados
- Laminillas cubre objeto 22x22 mm y 24x24mm
- Papel lente
- Papel “sanitas”
- Couplin
- Montante sintético Eukitt
- Hidróxido de Bario octohidratado ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) Merck
- Solución Salina Citratada (2X SSC)
- Ácido Clorhídrico 1N
- Ácido acético al 50%
- Ácido acético glacial
- Alcohol absoluto
- Alcohol al 70%
- Agua destilada en abundancia
- Agua corriente

- Nitrógeno líquido
- Orceína lacto acética al 2%
- Colorante Giemsa Merck, N°. 109204 al 2%

### **3.2. Equipo**

- Microscopio binocular marca Nikon, con contraste de fase, objetivos de 20X y 40 X y con campo de inmersión 100X, con cámara digital incorporada.
- Estereoscopio marca Nikon
- Baño maría con temperatura regulable
- Cámara digital

### **3.3. Lugar de ejecución del trabajo**

El desarrollo de la parte práctica del presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Evolutiva –Genética de Triatominos, de la Universidad de la República en Montevideo Uruguay. La revisión, disección y fijación de las gónadas de los triatominos en el laboratorio de Control Biológico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y el asesoramiento en la redacción en el Laboratorio de Citogenética de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **3.4. Material Biológico**

#### **3.4.1.-Recolección**

La colecta del material se realizó en las localidades de Santa Rita de Sigvas (43 ejemplares, 31 machos y 12 hembras) y Nazca (35 individuos, 33 machos y 2 hembras) (Imagen 2, Imagen 3).

Las colectas se realizaron en temporada de otoño (mayo y junio del 2009), la temperatura para Santa Rita de Sigwas osciló entre 19 y 27 grados centígrados y en Nazca entre 18 y 24 grados centígrados.

Para la colección se tuvo preferencia por los ejemplares de sexo masculino, la colecta se hizo de manera directa, utilizando guantes quirúrgicos, pinzas, frascos pequeños de plástico y etiquetas.

En la localidad de Santa Rita de Sigwas se procedió a revisar entre las grietas de las paredes de las casas (construidas de material conocido como “quincha”) y entre las uniones de los bloques de las paredes (con ayuda de las pinzas y una linterna), de preferencia la búsqueda se hizo en áreas con restos de heces frescas o secas, en seguida se procedió a coger los ejemplares adultos con las pinzas y colocarlos en los frascos de plástico previamente etiquetados con los datos de lugar, fecha, procedencia y cantidad de individuos colectados. La cantidad de triatomas encontrados dentro de las habitaciones y en el peridomicilio fue alta (Imagen 4a, 4b).

En la localidad de Nazca, la técnica de colecta fue la misma, obteniendo la mayor cantidad de muestras en los corrales (gallineros) ubicados dentro de las casas cuando se removían los bloques de “quincha”. En las habitaciones la presencia de *T. infestans* fue muy esporádica (Imagen 4c).

#### **3.4.2.- Método**

Para el presente trabajo se utilizaron las gónadas de 15 individuos machos, los que fueron procesados de acuerdo a la técnica de coloración convencional (Darlington & La Cour; 1969).

Se trabajo con 15 individuos machos de cada población, obteniendo por cada uno un aproximado de 18 a 21 láminas para revisión y análisis, haciendo un aproximado total por población de 300 placas en su mayoría meioticas.

### **3.4.3.- Preparación de material**

En el laboratorio, se disectaron los individuos machos con el objeto de extraer las gónadas. Para la extracción de las gónadas se colocó a cada ejemplar en una placa petri y con la ayuda de pinzas de punta fina y un estilete se les ubicó en posición ventral, primero se retiró la cabeza, los 2 pares de alas y luego se procedió a abrir el pronoto comenzando por los bordes, se usó un microscopio estereoscópico.

Luego de retirar el pronoto quitinoso, se buscaron las gónadas ubicadas en la parte ventral inferior del abdomen. Una vez identificadas las gónadas, se extrajeron, y se procedió a limpiarlas de algunos tejidos adheridos a ellas.

Las gónadas de inmediato fueron transferidas a una solución fijadora de Farmer (ácido acético glacial: alcohol absoluto 3:1) y llevadas a refrigeración a  $-4$  grados centígrados, para su conservación en frascos de 3 ml (imagen 5).

### **3.4.4.- Preparación de láminas**

Previamente a la preparación, se colocaron las láminas portaobjetos en HCl en un vaso de coloración ó couplin por un lapso de 24 horas, luego fueron transferidas a alcohol absoluto y finalmente se realizó el secado con papel "sanitas". Todo este procedimiento se hizo con la finalidad de tener láminas totalmente limpias.

### **3.4.5.- Aplicación de técnica de aplastado**

Se procedió luego a aplicar la técnica de aplastado "squash", para ello se extrajo con una pinza un trocito de gónada, colocándola en una lámina excavada que contenía una gota de ácido acético al 50%, el procedimiento se hizo usando el estereoscópico.

Se procedió a seccionar la gónada con la ayuda de una pinza en trocitos pequeños y luego se colocó un trocito pequeño en una lámina porta objeto previamente limpiada y se le agregó una gota de ácido acético al 50% para posteriormente cubrirla con una laminilla cubre objeto.

Para expandir la muestra se procedió a golpear la laminilla con la punta de un lápiz con golpecitos de manera concéntrica de adentro hacia afuera muy suavemente (si el material conservado está fresco) y un poquito más fuerte (si el material tiene mayor tiempo de conservado), luego se realizó el aplastado para lo que se colocó la lamina entre una hoja de papel “sanitas” y se realizó un aplastado directamente vertical, sobre una superficie totalmente plana, con el dedo pulgar sin girarlo ni moverlo, esto es importante para evitar que las células se superpongan .

Las láminas fueron observadas al microscopio de contraste de fases, enseguida se seleccionaron las muestras adecuadas por reunir los requerimientos para cumplir el objetivo de esta tesis.

Las láminas seleccionadas fueron pasadas por nitrógeno líquido para retirar luego el cubre objeto con la ayuda de un bisturí, levantando la laminilla por uno de sus extremos, así se evitó que se pierda la muestra. Las láminas se colocaron en un lugar libre de polvo, por un periodo mínimo de 24 horas.

#### **3.4.6.- Aplicación de la técnica de coloración bandeo “C” (Summers 1972) modificado por Panzera**

Se procedió a sumergir el material en los couplin conteniendo ácido clorhídrico 1N por un lapso de 15 minutos para hidrolizar el material, a temperatura ambiente.

Luego se dejó el material bajo un suave chorro de agua corriente durante 4-5 minutos y se lavó 3 veces con agua destilada.

Seguidamente se realizó una segunda inmersión del material en hidróxido de bario octohidratado (3 g en 60ml de agua destilada), durante 10 minutos a temperatura ambiente, (para desnaturalizar rápidamente la molécula de ADN).

Luego se realizó el lavado con agua destilada, varias veces, conteniendo gotitas de ácido acético glacial, esto para eliminar los restos de hidróxido de bario.

Por último se lavó con abundante agua corriente y al final con agua destilada.

Las muestras se transfirieron a un couplin que contenía una solución salina nitrada (20 ml de 2XSSC en 180 ml de agua destilada).

Los couplin que se colocaron en baño maría conteniendo solución salina citrada (SSC), hasta alcanzar una temperatura de 60 grados centígrados.

Las muestras permanecieron en baño maría 20 minutos.

Posteriormente las muestras procesadas fueron lavadas con agua destilada por unos minutos (menos de 5 minutos), para proceder luego a la coloración.

#### **3.4.7.- Coloración**

Para la coloración se utilizó una solución de Giemsa de 1 ml (solución madre) en 50 ml de agua destilada y las muestras fueron colocadas en el couplin con ese contenido por un tiempo de 2 minutos como máximo.

Las láminas se sacaron del couplin y fueron secadas al ambiente. En algunas ocasiones se ayudó al secado usando papel "sanitas".

#### **3.4.8.- Montaje**

Se dispuso el papel "sanitas" sobre una superficie plana y luego se colocaron las láminas ya secas del día anterior a las que se añadió en el centro de la muestra una gota de montante (se verificó la presencia de la muestra observando la lámina al



trasluz), luego se colocó el cubre objeto de tamaño igual al de la laminilla que se utilizó al hacer el aplastado (22 x 22 milímetros ó 24 x 24 milímetros).

Finalmente, se colocó sobre los portaobjetos un peso y se dejó por un mínimo de 24 horas para que el material quede firmemente adherido (imagen 6).

Luego se llevó al microscopio para la revisión y para marcar las coordenadas correspondientes a las placas útiles para nuestro objetivo.

Se tomaron las fotografías y se seleccionaron las mejores muestras por individuo (imagen 7).

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1.- Población de Nazca**

En las placas meióticas procesadas se ha podido identificar la presencia de 11 pares cromosómicos identificados como pares I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y el par sexual XI (Figura 1).

El conjunto cromosómico de *Triatoma infestans* está constituido por 10 pares de autosomas y 1 par de cromosomas sexuales, los cuales tienen ubicación central en metafases I y II de la meiosis (Figura 2).

Se ha observado también la presencia de células poliploides, de función aun desconocida (Figura 3) y con formación de un cromocentro característico (Figura 4).

Los cromosomas autosómicos se caracterizan por presentar bandas heterocromáticas que son de tipo A, B y C con las variantes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>. Las bandas son

teloméricas, aunque también se han hallado bandas intersticiales en la mayoría de las placas analizadas (Figura 5a, 5b, 5c).

En cuanto a los cromosomas sexuales, el cromosoma Y siempre se encuentra heterocromatizado el que responde a la coloración como “C” positivo. El cromosoma X casi siempre es fuertemente heterocromático (“C” positivos) aunque existen excepciones (Figura 6).

El sistema de determinación del sexo en *Triatoma infestans* es de tipo XX-XY.

Se ha podido determinar que los cromosomas de esta especie son de tipo holocéntricos, lo que se evidencia durante anafase meiótica, por la ubicación y la migración de los cromosomas al carecer de un centrómero definido.

En cuanto a los bloques heterocromáticos presentes en los cromosomas podemos decir que:

- En los pares autosómicos I y II se encontraron bandas de tipo BB en homocigosis, para todos los individuos (100%).
- En el par autosómico III, se encontró bandas de tipo BB en homocigosis (77,8%) y en heterocigosis AB (22,2%).
- En el par autosómico IV, se encontró bandas en homocigosis de tipo BB (33,3%), heterocigosis AB (33,3%) y homocigosis AA (33,3%).
- En el par autosómico V, se encontró bandas en homocigosis de tipo AA (88,9%) y heterocigosis de tipo AB (11,1%).

- En los pares VI y VII se encontraron bandas en homocigosis de tipo AA (100%).
- En el par autosómico VIII, se encontró bandas en heterocigosis de tipo AC (44,4%), homocigosis de tipo AA (44,4%) y homocigosis CC (11,1%).
- En el par autosómico IX, se encontró bandas en homocigosis de tipo CC (77,8%), homocigosis de tipo AA (11,1%) y heterocigosis AC (11,1%).
- En el par autosómico X, se encontró enteramente en todos los individuos la forma homocigoto CC (100%).
- En el par cromosómico sexual, el cromosoma "Y" siempre se presenta fuertemente heterocromático, el cromosoma X también se presenta heterocromático positivo en un 81,25%.
- En los cromosomas autosómicos la presencia de bandas intersticiales se evidencia en el 44,44% de los individuos analizados.
- El conjunto de cromosomas A+ B + I presenta una media aritmética de  $16.67 \pm 2.12$ .
- En los autosomas, el I total de bandas presenta una media aritmética de  $22.56 \pm 2.40$ .
- En las diferentes placas analizadas se ha podido encontrar que el número de cromosomas de la forma A, presentan un número promedio de  $8.78 \pm 0.97$ .
- El número de cromosomas de la forma B, presentan un promedio de  $6.89 \pm 1.36$ .
- Los cromosomas de la forma C se presentan en un promedio de  $4.33 \pm 1.22$ .
- En las muestras analizadas no se han encontrado cromosomas con satélite.
- Para determinar los pares de homólogos, se consideró la presencia de los tipos de bandas, así el individuo número 8136, presenta los pares I, II y III en homocigosis de la forma BB. El par IV es heterocigoto de la forma AB. Los pares V, VI, VII y VIII, son homocigotos de la forma AA y los pares IX y X, son

homocigotos de la forma CC, presenta 16 cromosomas con bandas del tipo A+B+I, en sus autosomas, y el total de bandas encontradas fue de 23. Cantidad de autosomas de tipo A =9, de tipo B=7 y de tipo C=4 y con banda intersticial =0 (Figura 7).

- El individuo 8137 presenta los pares I, II y III y IV homocigotos de la forma BB. Los pares V, VI, VII, VIII y IX homocigotos de la forma AA. El par X, homocigoto de la forma CC. La cantidad bandas de la forma A+B+I, en sus autosomas = 20 y el total de bandas encontradas fue de =26. La cantidad de autosomas de tipo A =10, de tipo B=8, de tipo C=2 y con banda intersticial =2 (Figura 8a-8b-8c).
- El individuo 8138 presenta los pares I, II, III y IV homocigotos de la forma BB. Los pares V, VI, y VII homocigotos de la forma AA .El par VIII, heterocigoto de la forma AC y los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en sus autosomas = 15 y el total de bandas encontradas fue de =23. La cantidad de autosomas de tipo A =7, de tipo B=8, de tipo C=5 y con banda intersticial =0.
- El individuo 8139 presenta los pares I, II, III y IV homocigotos de la forma BB. El par V, heterocigoto de la forma AB. Los pares VI, VII y VIII, homocigotos de la forma AA. El par IX, heterocigoto de la forma AC. El par X, homocigoto de la forma CC. La cantidad bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 19 y el total de bandas encontradas fue de =26. La cantidad de autosomas de tipo A =8, de tipo B=9, de tipo C=3 y con banda intersticial=2.
- El individuo 8144 presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. El par IV, heterocigoto de la forma AB. Los pares V, VI, y VII, homocigotos de la forma AA. El par VIII, heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 18 y el total de bandas encontradas fue de=22. La

cantidad de autosomas de tipo A = 8, de tipo B = 7, de tipo C = 5 y con banda intersticial = 3 (Figura 9a, 9b).

- El individuo 8146, presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. Los pares IV, V, VI y VII homocigotos de la forma AA. El par VIII, heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 15, y el total de bandas encontradas fue de = 21. La cantidad de autosomas de tipo A = 9, de tipo B = 6, de tipo C = 5 y con banda intersticial = 0
- El individuo 8149, presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. El par IV, heterocigoto de la forma AB. Los pares V, VI, VII y VIII, homocigotos para la forma AA. Los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 18 y el total de bandas encontradas fue de = 23. La cantidad de autosomas de tipo A = 9, de tipo B = 7, de tipo C = 4 y con banda intersticial = 2 (Figura 10).
- El individuo 8150, presenta los pares I y II homocigotos de la forma BB. El par III, heterocigoto de la forma AB. Los pares V, VI, y VII, homocigotos de la forma AA. El par VIII, heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 15 y el total de bandas encontradas fue de = 20. La cantidad de autosomas de tipo A = 10, de tipo B = 5, de tipo C = 5 y con banda intersticial = 0 (Figura 11).
- El individuo 8185, presenta los pares I y II homocigotos de la forma BB. El par III, heterocigoto de la forma AB. Los pares IV, V, V y VII, homocigotos de la forma AA. Los pares VIII, IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 14 y el total de bandas

encontradas fue de  $n=19$ . La cantidad de autosomas de tipo A =9, de tipo B=5, de tipo C=6 y con banda intersticial =0 (Figura 12a, 12b, 12c) (Tabla 1).

#### **4.2.-Población de Santa Rita de Sigvas**

Al igual que en la población de Nazca se utilizaron las gónadas de 15 individuos machos, los que fueron procesados de acuerdo a la técnica convencional (Darlington & La Cour, 1969), luego del análisis citogenético realizado, se ha podido determinar que:

En las placas meióticas procesadas se ha podido identificar la presencia de 11 pares cromosómicos identificados como pares I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y el par sexual XI (Figura 13). Igualmente la presencia de células poliploides de función aun desconocida (Figura 14) y la presencia de un centrómero característico (Figura 15).

También se han encontrado variantes en las bandas heterocromáticas de tipo A, B y C con variantes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> (Figura 16a, 16b, 16c), ubicación central de los cromosomas sexuales (Figura 17).

Se han encontrado que en los ejemplares de la zona de Santa Rita de Sigvas existen similitudes en cuanto al numero , al sistema de determinación del sexo, el centrómero; pero las diferencias se han manifestado en el tamaño, ubicación frecuencia y numero de bandas tal como:

- En los pares autosómicos I y II se encontraron bandas de tipo BB en homocigosis, para todos los individuos (100%).
- En el par autosómico III se encontró bandas en homocigosis del tipo el tipo BB (71,43%) y en heterocigosis AB (28,57%).

- En el par autosómico IV, se encontraron banda homocigosis de tipo AA (71,43%) y en heterocigosis AB (28,57%).
- En los pares autosómicos V y VI, se encontró bandas de tipo AA en homocigosis, para todos los individuos.
- En el par autosómico VII, se encontró el tipo AA (71,43%) en homocigosis y AC (28,57%) en heterocigosis.
- En el par autosómico VIII, se encontraron bandas de tipo AC en heterocigosis (85,72%) y en homocigosis AA (14,23%).
- En el par autosómico IX, se encontraron bandas en homocigosis de tipo CC (85,72%) y en heterocigosis AC (14,28%).
- En el par autosómico X, se encontró bandas en homocigosis de tipo CC (100%).
- En los cromosomas autosómicos la presencia de bandas intersticiales se evidencia en el 28,57% de los individuos analizados.
- El conjunto de cromosomas A+B+I presenta una media aritmética de  $15.86 \pm 1.86$ .
- En los autosomas, el total de bandas presenta una media aritmética de  $21.00 \pm 1.15$ .
- En las diferentes placas analizadas se ha podido encontrar que el número de cromosomas de la forma A, presentan un número promedio de  $9.00 \pm 0.82$
- El número de cromosomas de la forma B, presentan un promedio de  $6.00 \pm 0.82$ .
- Los cromosomas de la forma C se presentan en un promedio de  $5.00 \pm 0.58$ .
- En el par cromosómico sexual, el cromosoma "Y" siempre se presenta fuertemente heterocromático, el cromosoma X también se presenta heterocromático positivo en un 81,25%.

- Para determinar los pares de homólogos, se consideró la presencia de los tipos de bandas, así el individuo 8157, presenta los pares I y II homocigotos de la forma BB. El par III, heterocigoto de la forma AB. Los pares IV, V, VI y VII, homocigotos de la forma AA. El par IX, heterocigoto de la forma AC. Los pares X y XI, homocigotos para la forma CC.
- El individuo 8157 presenta 15 cromosomas con bandas de tipo A+B+I, en sus autosomas, y el total de bandas encontradas fue de =20. La cantidad de autosomas de tipo A = 10, de tipo B=10, de tipo C=5 y con banda intersticial=0.
- El individuo 8160 presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. Los pares IV, V, VI y VII, homocigotos de la forma AA. El par VIII heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos para la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 15 y el total de bandas encontradas fue de =21. La cantidad de autosomas de tipo A = 9, de tipo B=6, de tipo C=6, y con banda intersticial =0 (Figura 18).
- El individuo 8161, presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. Los pares IV, V y VI homocigotos de la forma AA. Los pares VII y VIII, heterocigotos de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos para la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 14 y el total de bandas encontradas fue de =20. La cantidad de autosomas de tipo A = 8, de tipo B=6, de tipo C=6 y con banda intersticial =0 (Figura 19a, 19b).
- El individuo 8162, presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. El par IV, heterocigoto de la forma AB. Los pares V, y VI homocigotos para la forma AA. Los pares VII, VIII y IX heterocigotos de la forma AC. El par X, homocigoto de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 18 y el total de bandas encontradas fue de =22. La cantidad de autosomas de tipo A = 8, de tipo B=7, de tipo C=4, y con banda Intersticial =3 (Figura 20a, 20b, 20c).



- El individuo 8165, presenta los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. Los pares IV, V, VI y VII homocigotos de la forma AA. El par VIII, heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos para la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 15 y el total de bandas encontradas fue de =21. Cantidad de autosomas de tipo A = 9, de tipo B=6, de tipo C=5 y con banda intersticial =0.
- El individuo 8169, presenta en los pares I y II homocigotos de la forma BB. El par III, heterocigoto de la forma AB. Los pares IV, V, VI y VII homocigotos de la forma AA. El par VIII, heterocigoto de la forma AC. Los pares IX y X, homocigotos de la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 15 y el total de bandas encontradas fue de =20. La cantidad de autosomas de tipo A = 10, de tipo B=5, de tipo C=5 y con banda intersticial =0 (Figura 21a, 21b).
- El individuo 8170, presenta en los pares I, II y III homocigotos de la forma BB. El par IV, heterocigoto de la forma AB. Los pares V, VI, VII y VIII, homocigotos para la forma AA. Los pares IX y X, homocigotos para la forma CC. La cantidad de bandas de la forma A+B+I, en los pares autosómicos = 19 y el total de bandas encontradas fue de =23. La cantidad de autosomas de tipo A = 9, de tipo B=7, de tipo C=4 y con banda intersticial =3 (Figura 22a ,22b) (Tabla 2).

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

En 1909, Payne realizó la primera descripción del número de cromosomas de los *Triatominae*, posteriormente el grupo de Giorgio Schreiber en Minas Gerais (Brasil) continuó las descripciones desde 1950 hasta principios de la década del 70 (Dujardin et al., 2002).

En el presente trabajo, se ha confirmado que el número cromosómico de *Triatoma infestans* pertenecientes de las localidades de Nazca y Santa Rita de Siguanilla coincide

con el cariotipo descrito por Schreiber y Pellegrino (1950) de  $2n=22$  donde 20 son autosomas y un par sexual (Citado en Dujardin et al., 2002).

Dujardin et al, (2002), detectó que todas las especies de Triatominae analizadas presentaban cromosoma Y heterocromatizado. Muchas de las especies también presentaban heterocromatina C en sus autosomas y sólo unas pocas especies sobre el cromosoma X. En poblaciones de Uruguay que pertenecen al grupo no andino, el cromosoma Y, muestra un largo bloque C- positivo (banda C), mientras el cromosoma X carece de éste (Panzera et al., 1992).

Para nuestras poblaciones hemos encontrado el cromosoma X heterocromatizado en un 81,25%, para ambas localidades, lo que las ubica dentro de las poblaciones pertenecientes al grupo andino, esto de acuerdo a la clasificación dada por Panzera 2007.

El número diploide en los machos varía entre  $2n=21$  y  $2n=25$ , siendo el más frecuente  $2n=22$  cromosomas. Esta variación se debe fundamentalmente al sistema de determinación cromosómica del sexo que presentan los triatomíneos, así tenemos que en los machos se han descrito tres sistemas ó mecanismos sexuales diferentes : XY,  $X_1X_2Y$  y  $X_1X_2X_3Y$ , un cuarto mecanismo ( $X_1X_2Y_1Y_2$ ) pendiente de confirmación en el género *Mepraia* (Panzera, 2007).

Nosotros hemos encontrado el mecanismo sexual XX correspondiente a las hembras y XY correspondiente a los machos de *T. infestans*, corroborando para ambas poblaciones lo encontrado por Schreiber y Pellegrino (1950), (Panzera, 1992).

El cromocentro, en las poblaciones de Uruguay se forma por la unión de los bloques heterocromáticos de los tres pares autosómicos más largos y los cromosomas sexuales. Los dos pares largos contienen dos bloques de heterocromatina

localizados cerca al final del cromosoma, mientras el tercer par exhibe un solo bloque simple terminal (Panzera, 1992).

Se ha encontrado que en las poblaciones analizadas, durante la profase I se observa un cromocentro característico y definido, para nuestras poblaciones el cromocentro estaría constituido por los cromosomas autosómicos heterocromáticos y los cromosomas sexuales.

Existe la referencia que *Triatoma infestans* tiene bloques heterocromáticos relativamente grandes en algunos de sus pares cromosómicos lo que representa entre el 25 y 45 % del complemento cromosómico, dependiendo de la población analizada (andino o no andino) Panzera, 2007. La cantidad de heterocromatina puede variar entre 0 y 45% del total del complemento autosómico (Panzera et al., 1995). Puede encontrarse en un par cromosómico, 2 pares, 3 pares ó en los 10 pares de autosomas. En general se localiza en los extremos cromosómicos, pudiendo estar en uno solo ó en ambos extremos del cromosoma. (Dujardin et al., 2002).

En las poblaciones de Perú analizadas, hemos encontrado que tanto para los individuos de la localidad de Nazca como para los de Santa Rita de Siguan, la presencia de cromosomas autosómicos heterocromáticos varía entre 14 y 20, característica que manifiesta el grupo andino.

Con la aplicación de la técnica del bandeo "C" y el análisis detallado del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis de machos, se ha podido identificar una extensa variabilidad de las regiones heterocromáticas (a nivel de su cantidad, distribución a lo largo del cromosoma, naturaleza y comportamiento de la heterocromatina) tanto a nivel inter como intraespecífico. Es así, que se ha logrado detectar una extensa variabilidad cromosómica intrapoblacional en *T. infestans* (Panzera et al., 1992; 2004).

En *Triatoma patagónica* (que se distribuye en Argentina) la presencia de bandas intersticiales en los cromosomas autosómicos, se menciona excepcional y se constituyó en una característica específica y diferencial de especie (Dujardin et al., 2002).

Nosotros hemos encontrado la presencia de bandas intersticiales en los cromosomas autosómicos, en un porcentaje de 44,44% para los individuos de la localidad de Nazca y 28,57% para los individuos de la localidad de Santa Rita de Sigüas. También hemos encontrado polimorfismos heterocromáticos (variaciones en cuanto a los bloques, variantes de las formas cromosómicas A,B y C), cantidad y distribución dentro de una misma población y entre ambas poblaciones, muy semejantes al polimorfismo cromosómico intraespecífico encontrado como primera referencia en las poblaciones naturales de Uruguay, las cuales pertenecen al grupo no-andino.

Reconstrucciones históricas sobre las migraciones humanas indican que la dispersión de las formas domésticas de *T. infestans* ocurrió durante los últimos 100 ó 150 años, desde el sur de Bolivia hacia el resto de su distribución geográfica (Panzera et al., 2007).

A comienzos del siglo 20, esta especie invadió Uruguay, Perú y Brasil, alcanzando el estado de Bahía a partir de 1.970 y en el norte de Brasil (Panzera et al., 2007).

Durante la dispersión de *T. infestans*, ya doméstico, desde los valles andinos de Bolivia hacia otras regiones de Bolivia y Perú, esta especie mantuvo inalterado su tamaño genómico (Dujardin & Tibayrenc, 1985b; Dujardin et al., 1998) (Citado en Panzera et al., 2007)

Por los resultados encontrados para ambas poblaciones (localidad de Nazca, baja altitud) y mediana altitud (localidad de Santa Rita de Sigüas) proponemos que la ruta de ingreso de los individuos costeros de *T. infestans* de las poblaciones estudiadas, tuvo que ser distinta a la propuesta desde los valles andinos de Bolivia, que menciona

un desplazamiento pasivo (sin alteración del tamaño genómico) desde Bolivia, pasando por los andes peruanos, llegando a la costa peruana. La evidencia encontrada está en que los individuos de Nazca presentan mayor cantidad de heterocromatina que los de Santa Rita de Siguan (a pesar de existir poca diferencia).

Según la hipótesis sugerida por Panzera et al., (2004), la drástica reducción del genoma que experimentaron los insectos del grupo no-andino resultó en nuevas combinaciones génicas que favorecieron su adaptabilidad a sobrevivir y reproducirse en distintos ambientes, los insectos pertenecientes al grupo andino estarían mejor adaptados y colonizarían con mayor éxito ambientes de gran altitud, en cambio los no-andinos estarían mejor adaptados a ambientes de baja altura.

Los resultados hallados en el presente trabajo nos permiten proponer que estamos frente a individuos con genoma andino bastante bien adaptados a baja y mediana altitud en contraste a la hipótesis de Panzera et al., (2004). Proponemos que se trataría de individuos con distintos patrones cromosómicos los que habrían colonizado inicialmente las zonas costeras del Perú (baja altitud) y los pertenecientes a mediana altitud (Santa Rita de Siguan) y ambos ingresos se habrían dado por desplazamientos pasivos, o estaríamos frente a individuos (los costeros), que inicialmente migraron de la sierra peruana, pero que al ir adaptándose al nuevo ambiente, han ido variando sus patrones cromosómicos que los hace ser exclusivamente peridomiciliarios y domiciliarios ya que no se tiene registro de presencia de *Triatoma infestans* en ambientes silvestres (Comunicación con Jenny Anca, Laboratorio de Chagas, Universidad Cayetano Heredia- Arequipa).

Finalmente, el estudio realizado para las poblaciones de Nazca y Santa Rita de Siguan, muestra individuos andinos, (por la presencia de patrones característicos en

los bloques heterocromáticos), con particularidades (polimorfismos), propias de poblaciones no-andinas y que tienen exclusiva adaptación al ambiente peridoméstico y doméstico.

Para esclarecer la ruta migratoria de *T. infestans* a la costa sur peruana tomamos los siguientes datos. Los primeros estudios genéticos de la estructura poblacional de esta especie se realizaron mediante la aplicación de electroforesis de isoenzimas (Dujardin y Tibayrenc, 1985 a,b; Dujardin et al., 1987). El análisis de 19 loci enzimáticos en poblaciones andinas de Bolivia y Perú reflejó baja proporción de loci variables (3/19= 15,79%).

Estos estudios indicaron una aparente ausencia de especiación entre poblaciones separadas geográficamente, una libre fluidez de genes dentro de *T. infestans* de una localidad especificada (dada) y algunas veces entre localidades cercanas. Estos primeros estudios sugirieron que el proceso de dispersión de individuos de Bolivia hacia Perú fue reciente.

Sin embargo para el año 1997, el análisis de isoenzimas en 2 áreas diferentes de Arequipa, Santa Rita de Sigwas y Arequipa (ciudad), mostró la existencia de estabilidad temporal de genotipos en Santa Rita de Sigwas, una alta diferencia genética entre poblaciones de Arequipa y Santa Rita de Sigwas lo que sugiere menor contacto entre ellas, un origen múltiple de las poblaciones de *T. infestans* de Arequipa, para la ciudad y los valles, además de una pobre capacidad de dispersión de *T. infestans* (la unidad panmíctica se reduce a su región) (Breniere, S.F.; Lopez,J.; Vargas F.; Barnabé C.1 997. Genetic Variability and Microdistribution of *Triatoma infestans* Genotypes and *Trypanosoma cruzi* Clones in Arequipa Region (Peru) Memorias do Instituto Oswaldo Cruz v.92 n.3).

Tenemos entonces que las poblaciones de *Triatoma infestans* de Arequipa (ciudad) y (valle) localizadas a diferente altitud presentan diferencias génicas y poca dispersión.

Las diferencias encontradas en estudios enzimáticos corroborarían que los individuos de los valles de Arequipa pertenecerían a un grupo distinto de los de Arequipa ciudad y pertenecerían al mismo tipo de individuos de la zona costera del país.

## VI. CONCLUSIONES

1.- El número cromosómico de *Triatoma infestans* para ambas poblaciones queda definido como  $2n = 22$  (20 cromosomas autosómicos y un par sexual XX para las hembras y XY para los machos), los individuos de las poblaciones de *T. infestans* analizadas no presentan sistema de determinación sexual múltiple, manteniendo el número primitivo de XX/XY.

2.- Se detectaron polimorfismos cromosómicos en la cantidad y localización de las regiones heterocromáticas a nivel de los autosomas.

3.- Las variaciones polimórficas fueron detectadas entre individuos de una misma población y entre individuos de ambas poblaciones.

4.- Existen diferencias mínimas a nivel de la cantidad de heterocromatina entre las poblaciones de Ica y Arequipa analizadas.

5.- Los ejemplares estudiados tienen características del grupo andino por la presencia de 14 a 20 cromosomas heterocromáticos sin embargo también presentan bandas intersticiales característico de las no andinas, polimorfismos en cuanto a distribución y localización de bloques heterocromáticos que también son características de las poblaciones no andinas (Uruguay).

6.- Se encuentra por primera vez en Perú una población con características citogenéticas pertenecientes al grupo andino, ubicada a baja altitud.

7.- La cantidad de formaciones de pares homocigotos BB en el par autosómico IV y la presencia de mayor número de bandas intersticiales en la población de Nazca, nos da como resultado mayor cantidad en promedio de heterocromatina para esta población.

8.- Por las diferencias en cuanto a cantidad de heterocromatina encontrada para ambas poblaciones, podemos sugerir que la ruta de ingreso de los individuos de la



zona costera de Perú, no fue desde los andes peruanos, es posible que su ruta de ingreso haya sido desde Chile o tratarse de poblaciones con distintos procesos adaptativos.

9.- Las poblaciones de *Triatoma infestans* del sur de Perú, son eminentemente peridomesticas y domésticas, no se tiene reporte de individuos silvestres.

10.- Concluimos, que en lo concerniente a las bandas heterocromáticas presentadas por *T. infestans* de Perú, estamos frente a poblaciones andinas con características particulares del grupo no-andino, como en el mencionado modelo uruguayo.

## VII. RECOMENDACIONES

Hasta la fecha el conocimiento de la genética de las poblaciones peruanas de *Triatoma infestans* es muy reducida, es importante incrementar los proyectos de investigación que involucren la citogenética clásica y molecular, lo que reforzaría la base teórica del conocimiento de este material biológico, la clasificación, el conocimiento del componente genético intra e interpoblacional, y replantear con mayor certeza las rutas migratorias de los individuos del sur de Perú.

La extensa variabilidad cromosómica detectada, sobre todo en los bloques heterocromáticos, convierten a la citogenética en una herramienta de gran utilidad en estudios taxonómicos, evolutivos y poblacionales.

Por la sencillez, validez y la alta reproductibilidad de la técnica, así como por su variación entre las distintas especies, las bandas "C" se constituyen en un marcador cromosómico muy eficaz y sencillo para caracterizar y diferenciar especies, especialmente dentro del género *Triatoma*, por lo que recomendamos su utilización.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Alzogaray, R. 2003. El control químico de *Triatoma infestans* en Argentina. Revista de Toxicología en línea Retel. Trabajo de revisión 1-18.

Breniere, F.S., J. Lopez., F. Vargas., C. Barnabé. 1997. Genetic variability and microdistribution of *Triatoma infestans* genotypes and *Trypanosoma cruzi* clones in Arequipa region (Perú). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol 92(3):401-408.

Cornejo, J., 2008. Asis de la Estrategia de Prevención y Control de Enfermedades Metaxénicas.

Chávez, J. 2006. Contribución al estudio de los triatominos del Perú: Distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. Ann Fac. Med. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 67 (1):65-76.

Darlington, C. D. & L. F. La Cour; 1969. The handling of chromosomes. George Allin y V Ltd De Mal. W.E.

Dujardin, J.P., C. J. Schofield & F. Panzera. 2002. Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Academie Royale des Sciences D'outre-mer. Memoire in-8<sup>o</sup>, Nouvelle Série, Tome 25, fas.3.

Frías, L.D.2004. Formación de nuevas especies de los géneros *Mepraia* (hemiptera: Reduviidae) y *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae) y su relación con modificaciones de los patrones heterocromaticos y mutaciones sistémicas. I+I: Informes de Investigacion N° 5.

Frías, D.D. 2004. La Heterocromatina y su rol funcional. ISBN 956-299-217-9.

Galvao, C. 2003. A sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), De De Geer Ao DNA. Entomol.Vect- ISSN 0328-0381.

Lent,H. y Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (hemiptera, reduviidae), and their significance as vectors of chagas' disease. Bulletin of the American Museum of Natural History. Volume 163 : Article 3.

Organization Mundial de la Salud,2008. Enfermedad de Chagas: control y eliminación.

Informe de la Secretaría. EB124/17.

Panzer, F., F. Alvarez., J. Sanchez- Rufas., R.Pérez., A. J. Suja., E. Scvortzoff., J.P. Dujardin., E. Estramil., and R. Salvatella.1992. C- Heterocromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Genome.35: 1068-1074.

Panzer, F., R. Pérez., Y. Panzer., F. Alvarez., E. Scvrtzoff and R. Salvatella. 1994. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemíptera- Reduviidae). pp(8).

Panzer, F., J.P. Dujardin., P. Nicolini., M. N. Caraccio., V. Rose., T. Tellez., H. Bermúdez., M.D. Barges., S. Mas-Comas., J.E. O' Connor and R. Pérez. 2004. Genomic Changes of Chagas Disease Vector, South América. Emerging Infectious Diseases. 10 (3):438-446.

Panzer, F., R. Pérez., C. Lucero., I. Ferrandis., M. J. Ferreiro., L. Calleros and V. Romero. 2007. Cambios Genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma Infestans*. Libro Triatominos de Bolivia y la enfermedad de chagas. Cap VI: 80-104.

Pérez, R., F. Panzer., J. Page., J. A. Suja and J. Rufas. 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromosome Research. 5, 47-56.

Pérez, R., M. Hernández, V., L. Calleros and F. Panzer. 2003. Citotaxonomía y Evolución Cromosómica en Triatominae, Insectos Vectores de la Enfermedad de Chagas (Heteróptera- Reduviidae). Entomol. Vect. 10 (4):543-550.

Perez, R., J.S. Rufas., J.A. Suja., J. Page and F. Panzera.2000.Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromosome Research 8: 17-25.

Quintana,F.; 2009. Revisión Norma Técnica de Atención de Chagas.

Toloz, A.C., 2008. Estudio sobre la resistencia a insecticidas piretroides en huevos de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) de Argentina y Bolivia. Resumen de tesis de Maestría presentada en el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas. Revista de Patología Tropical. Vol. 37 (3): 291-293.

Yon, C., R. Balta., N. García., M. Troyes., H. Cumpa y A. Valdivia.2004. Susceptibilidad y Resistencia de *Triatoma infestans* y *Pastrongylus herreri* a los insecticidas piretroides Perú 2001. Rev. Perú Med Exp Salud Pública 21(3):179-182.

# IX. ANEXOS

TABLA 1

POBLACION ICA

NUM	S	Fmit	Fme	PARES										Bandas A+B+I	TOTAL BANDAS AUTOSOMICAS	AUTOSOMAS = 20			YRARO	cromosoma X	Autosomas	Fragment.	SAT
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			A	B	C		X C+	INT	F	
8136	M	SI	I,II	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	CC	CC	16	23	9	7	4	NO	SI	0	NO	NO
8137	M	SI	I	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	CC	20	26	10	8	2	NO	SI	2	NO	NO
8138	M	SI	I,II	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	23	7	8	5	NO	SI	0	NO	NO
8139	M	SI	NO	BB	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AC	CC	19	26	8	9	3	NO	SI	2	NO	NO
8144	M	SI	I	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AC	CC	CC	18	22	8	7	5	NO	SI	3	NO	NO
8146	M	SI	NO	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	21	9	6	5	NO	SI	0	??	??
8149	M	SI	NO	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	CC	CC	18	23	9	7	4	NO	??	2	NO	NO
8150	M	SI	NO	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	20	10	5	5	NO	NO	0	NO	NO
8185	M	NO	I, II	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	CC	CC	CC	14	19	9	5	6	NO	SI	0	0	0
	n = 9			M=9	H=0								MEDIA	16.67	22.56	8.78	6.89	4.33	% con Frag o sat = 0.00				
													SD	2.12	2.40	0.97	1.36	1.22					

SD = DESVIACION STANDARD

TABLA 2

POBLACION AREQUIPA

NUM	S	Fmit	Fme	PARES										Bandas A+B+I	TOTAL BANDAS  AUTOSOMICAS	AUTOSOMAS = 20			YRARO	cromosoma X	Autosomas	Fragment.	SAT
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			A	B	C		X C+	INT	F	
8157	M	SI	NO	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	20	10	5	5	NO	NO	0	NO	NO
8160	M	NO	I, II	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	21	9	6	5	NO	SI	0	0	0
8161	M	NO	I, II	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AC	AC	CC	CC	14	20	8	6	6	NO	SI	0	0	0
8162	M	SI	I	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AC	AC	AC	CC	18	22	8	7	5	NO	SI	3	0	0
8165	M	SI	II	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	21	9	6	5	NO	SI	0	0	?
8169	M	SI	I, II	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	AC	CC	CC	15	20	10	5	5	NO	SI	0	0	0
8170	M	SI	I, II	BB	BB	BB	AB	AA	AA	AA	AA	CC	CC	19	23	9	7	4	NO	SI	3	0	0
	n=7			M=7	H=0								MEDIA	15.86	21.00	9.00	6.00	5.00					
													SD	1.86	1.15	0.82	0.82	0.58		% con Frag o Sat = 0.00			

SD = DESVIACION STANDARD



Tabla 2

a)



Ejemplar macho



Ejemplar hembra

b)



Ejemplar macho



Ejemplar hembra

Imagen 1.-a) Ejemplares de Santa Rita de Sigwas, macho y hembra respectivamente. b)  
Ejemplares de Nazca, macho y hembra respectivamente.

Imagen 2.- Localidad de Santa Rita de Sigwas- Arequipa



Imagen 3.- Localidad de Nazca-Ica



a)



b)

c)



Imagen 4.- a),b) Insectos colectados en Nazca c) Insectos colectados en Santa Rita de Sigwas.



Imagen 5.- Gónadas fijadas en solución Farmer 3:1



Imagen 6.- Adhesión de material con montante sintético.



Imagen 7.-Equipo para la toma de fotografías.



## ILUSTRACIONES

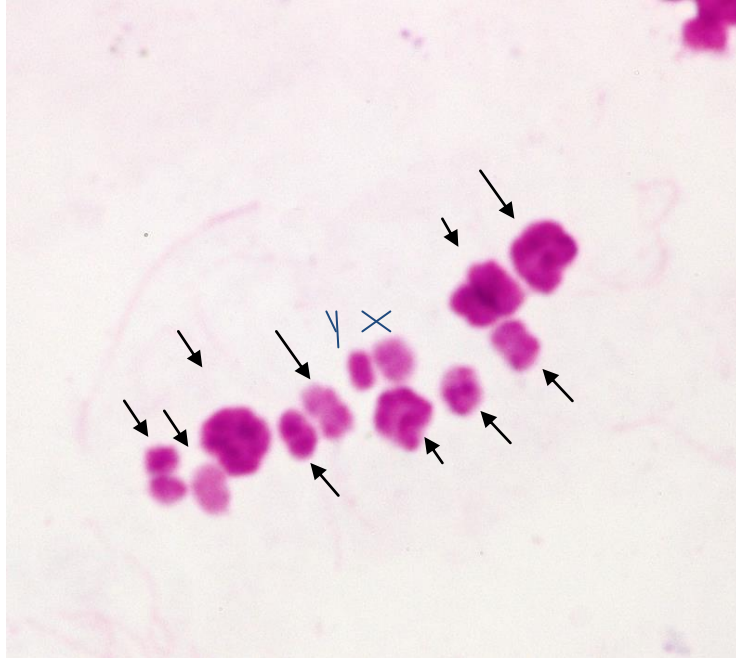


Figura 1.- Presencia de 11 pares cromosómicos identificados como pares I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y el par sexual XI.

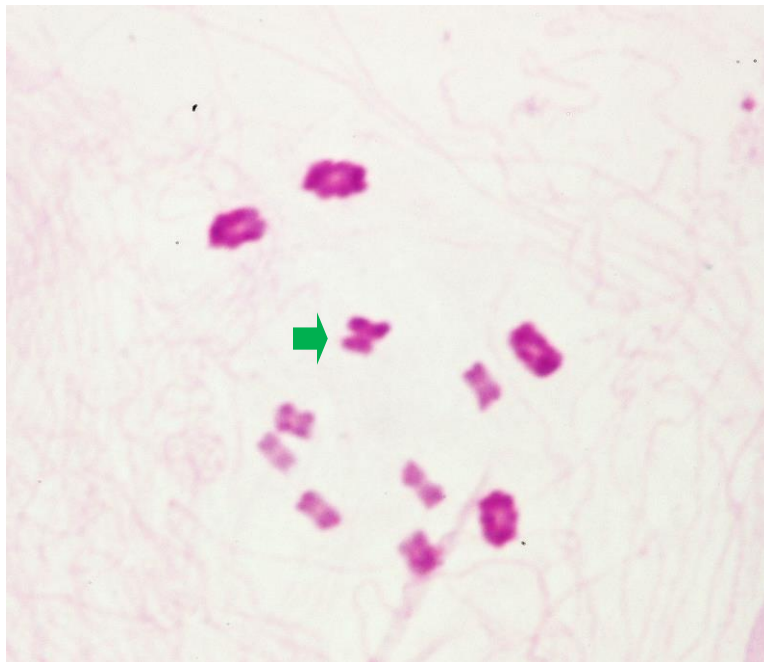


Figura 2.- Cromosomas sexuales, los cuales tienen ubicación central en metafases I y II de la meiosis.

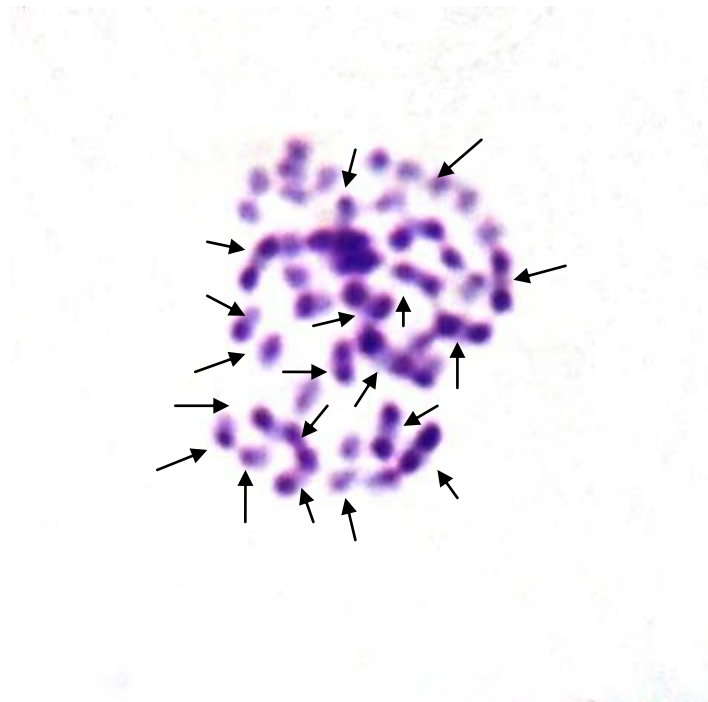


Figura 3.- Célula poliploide.

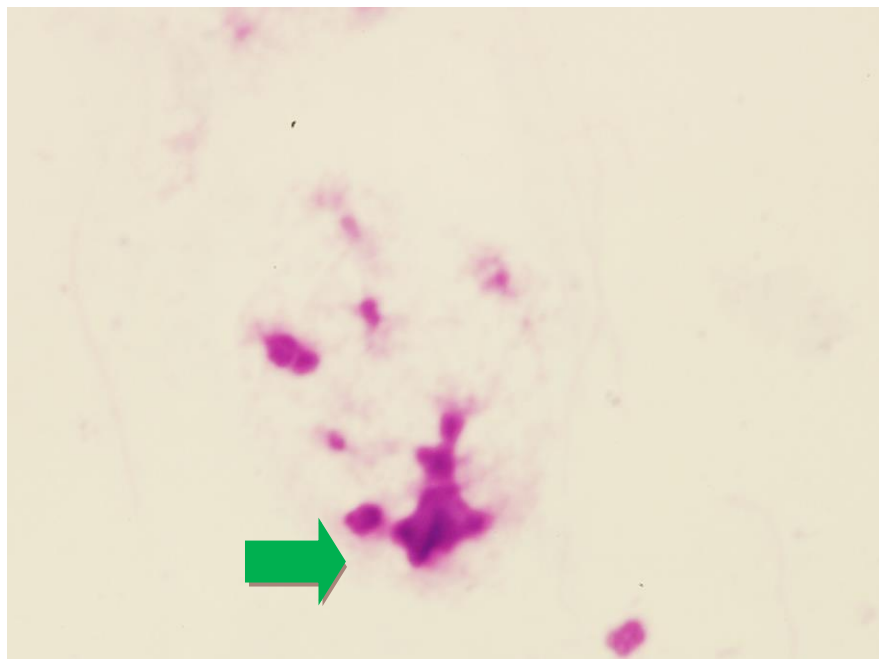


Figura 4.-Cromocentro característico.

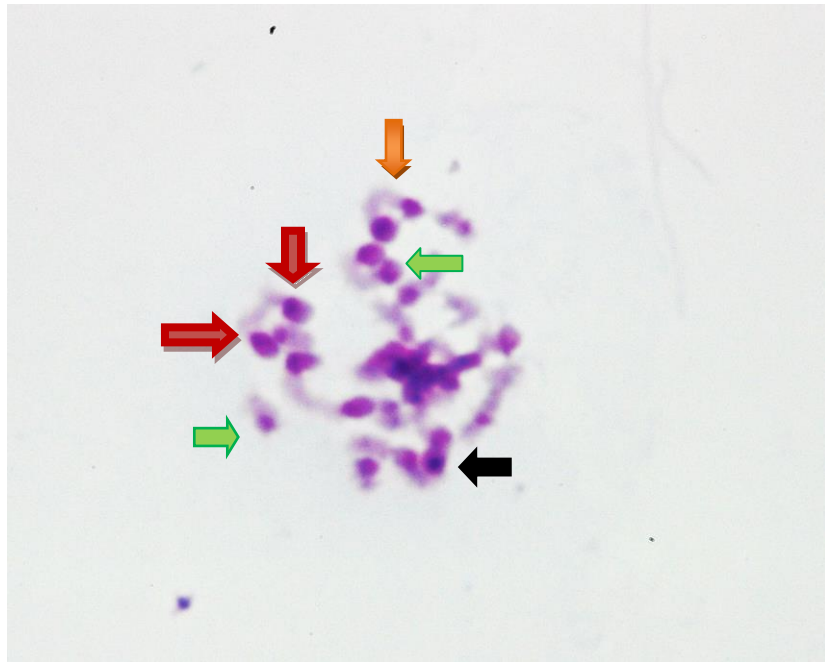


Figura 5.a) Cromosomas autosómicos presentan bandas, flecha naranja señala a la variante  $B_2$ , las flechas rojas variante  $B_3$ , la flecha negra variante  $A_2$  ó  $A_3$ , y las flechas verdes la variante  $A_1$ .

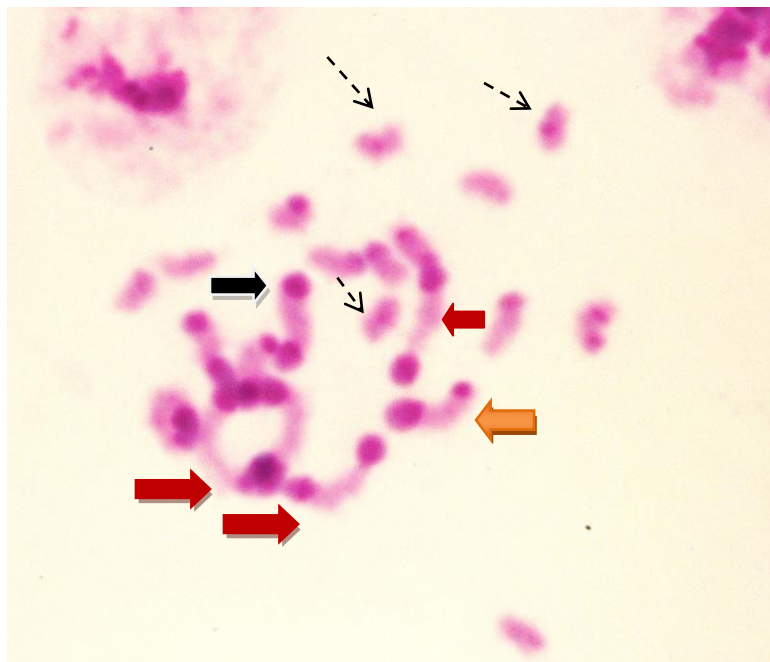


Figura 5.b) La flecha negra señala la variante  $B_1$ , la flecha naranja la variante  $B_2$ , las flechas rojas la variante  $B_3$ , y las flechas entrecortadas señalan las bandas intersticiales.



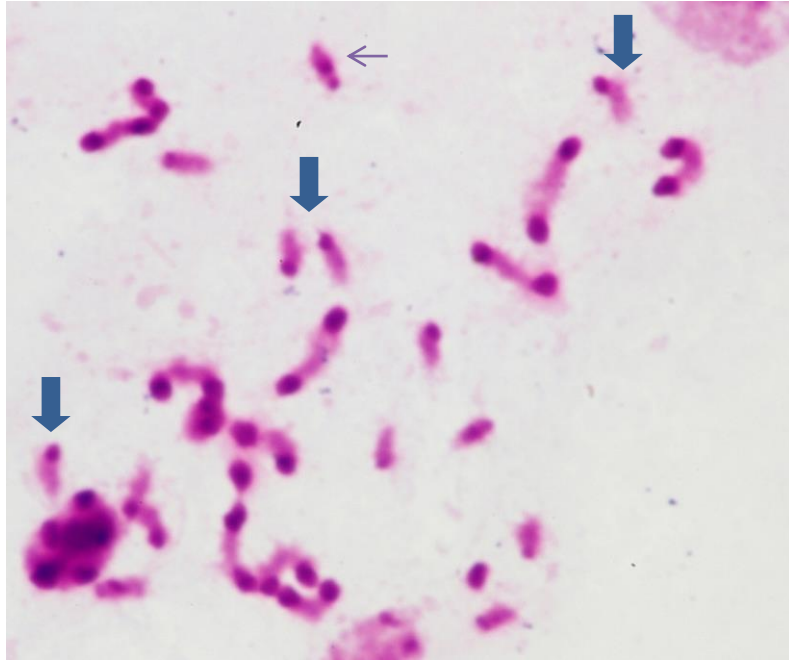


Figura 5.c) Las flechas azules indican variantes  $A_1$ , flecha entrecortada, banda intersticial.

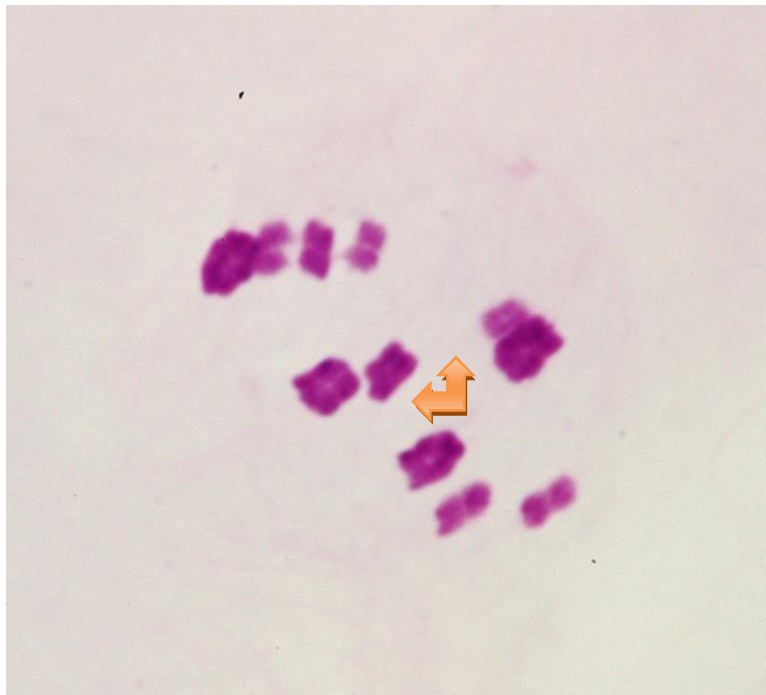


Figura 6.-Los cromosomas sexuales son heterocromáticos y tienen ubicación central.

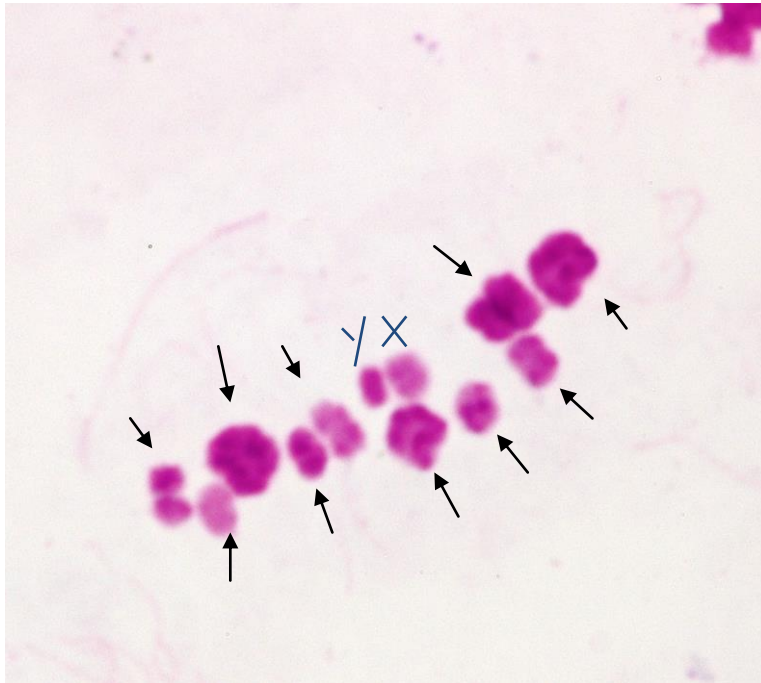


Figura 7.- Individuo 8136, las flechas indican la ubicación de los pares cromosómicos.

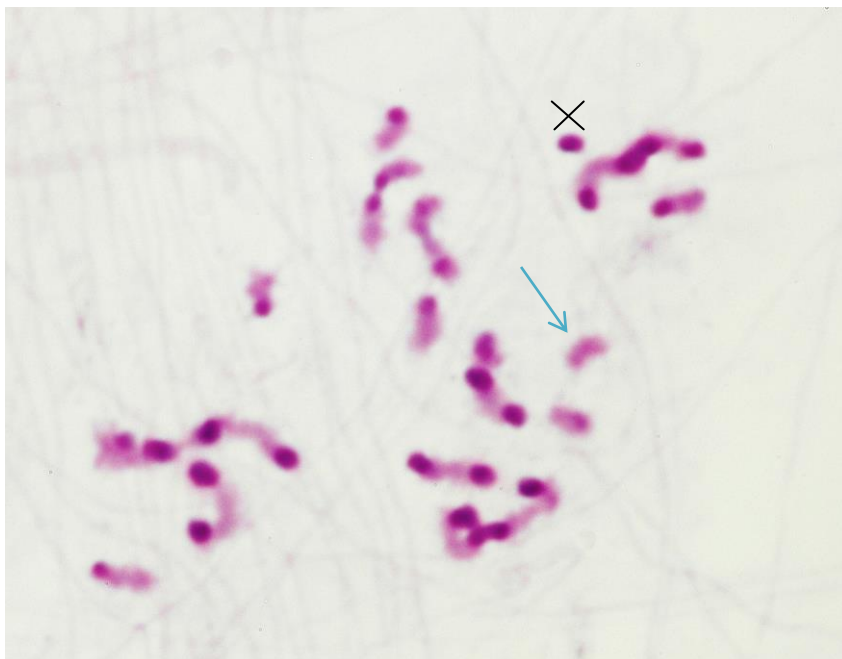


Figura 8a.) Individuo 8137, la flecha indica la banda intersticial y el cromosoma X heterocromático.

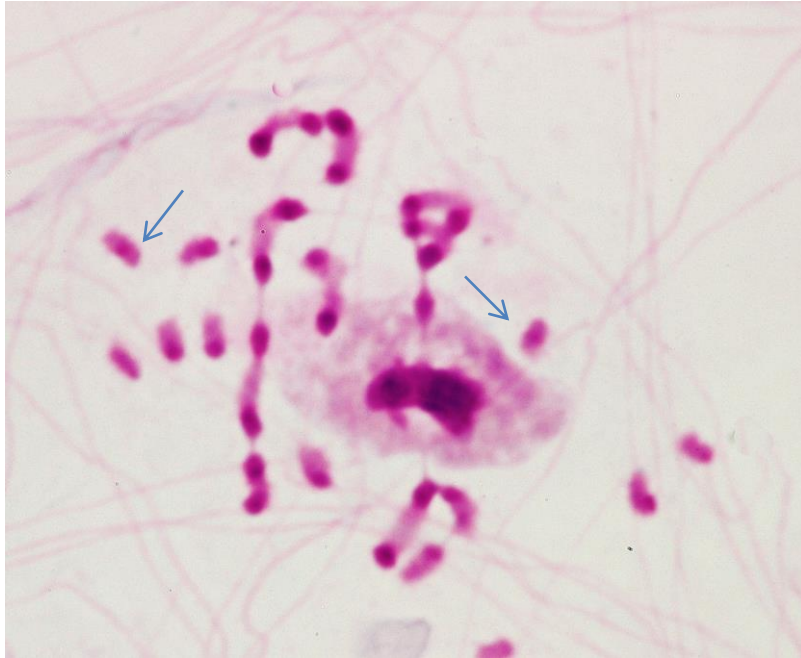


Figura 8b.) Las flechas indican las bandas intersticiales.

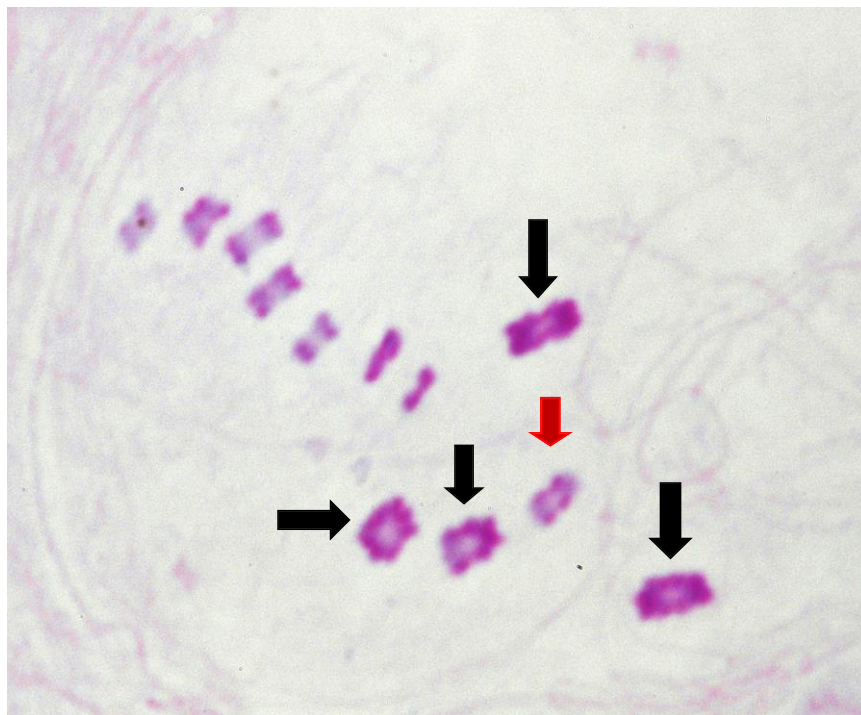


Figura 8.c) Las flechas negras indican las asociaciones de la forma BB, la flecha roja indica la asociación AA.

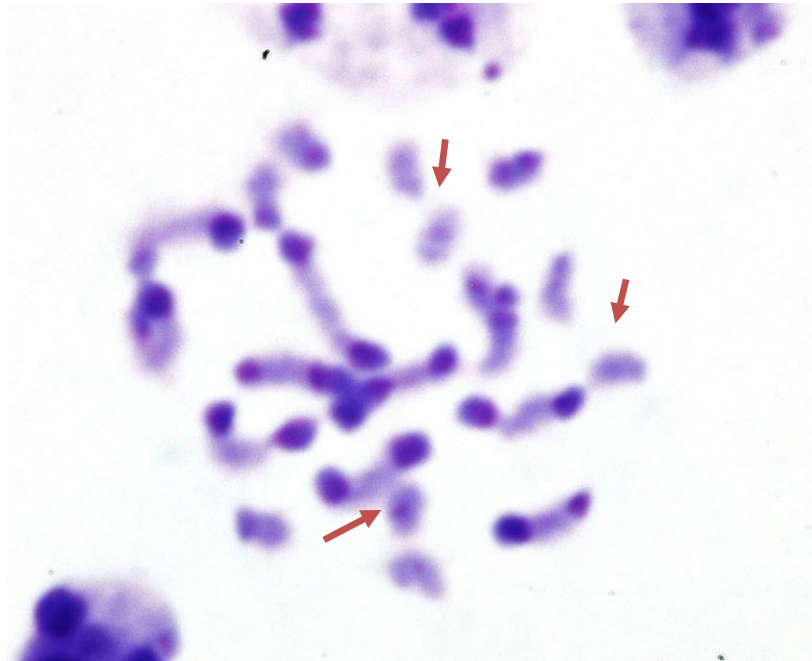


Figura 9.a) Individuo 8144, las flechas indican las bandas intersticiales.

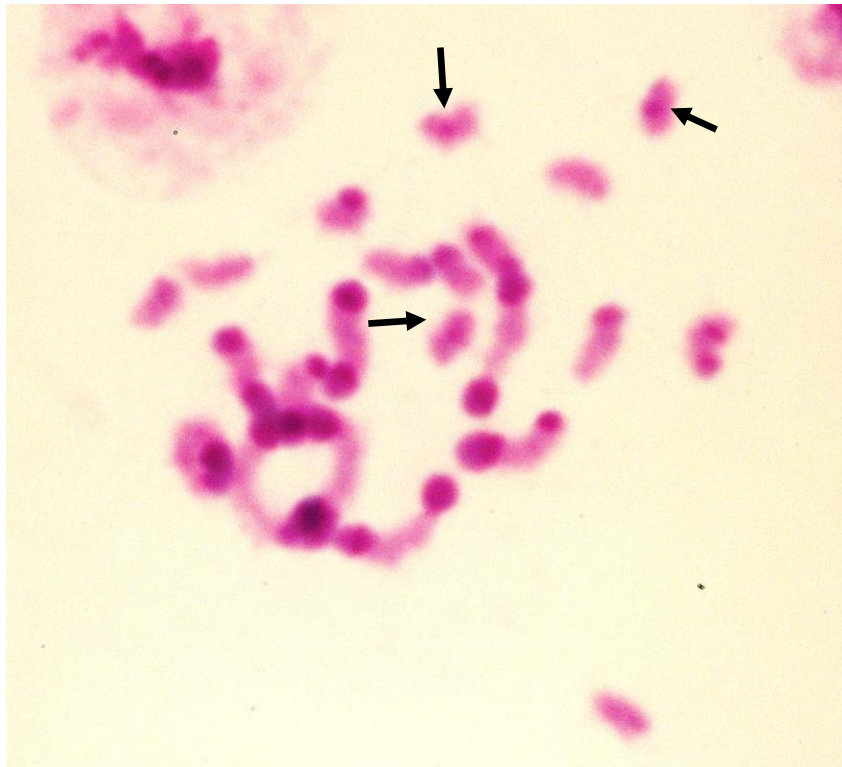




Figura 9.b) Las flechas indican las bandas intersticiales.

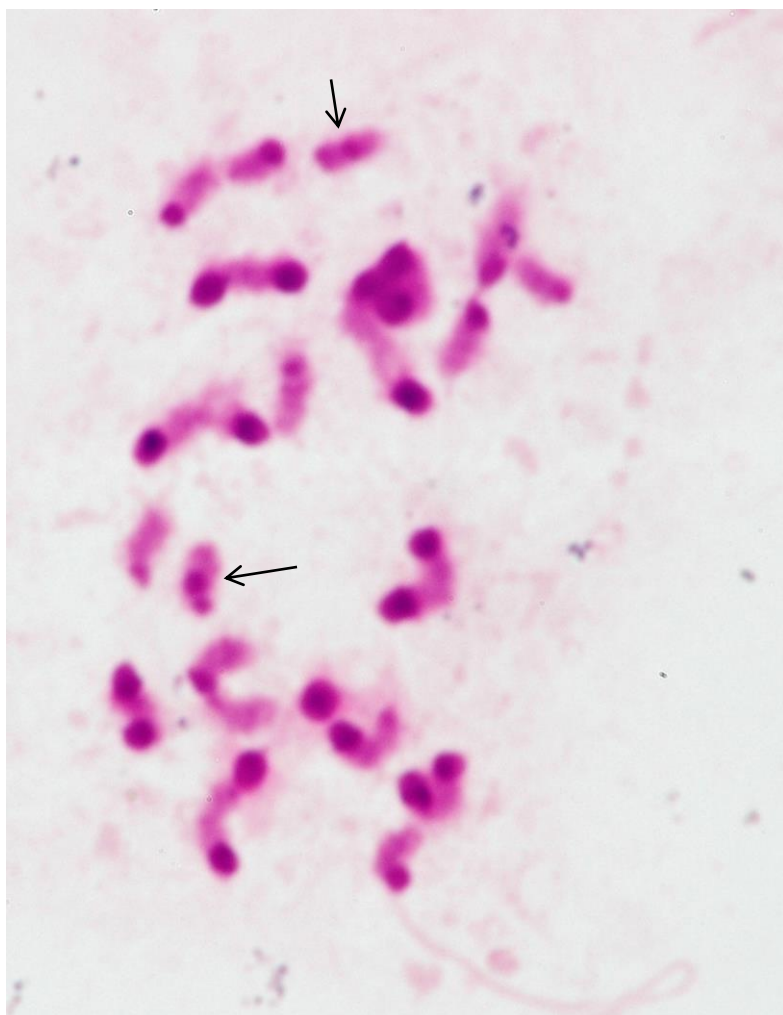


Figura 10.- Individuo 8149, las flechas indican las bandas intersticiales.

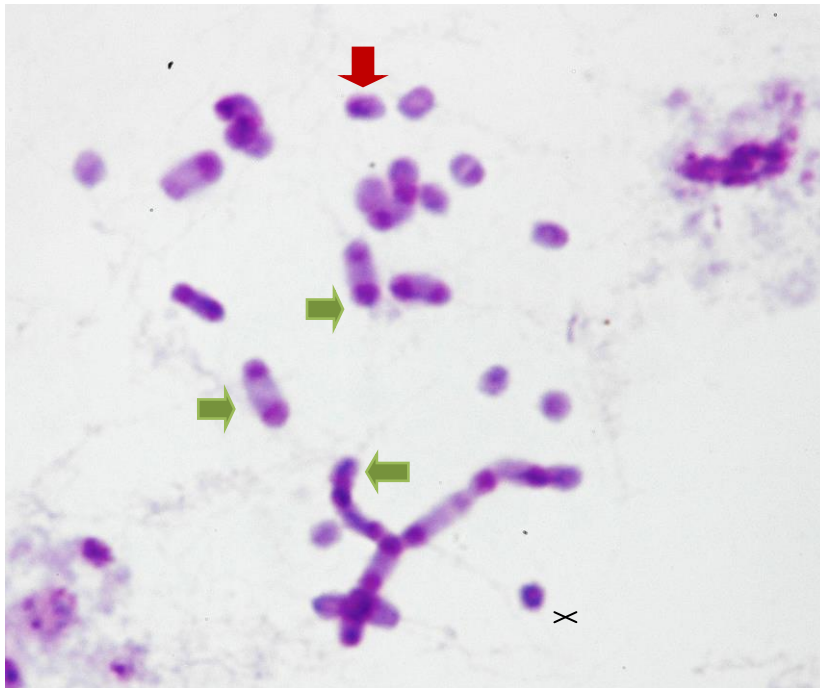


Figura 11.- Individuo 8150, las flechas rojas indican cromosomas tipo A, flechas verdes de tipo B y el cromosoma X.

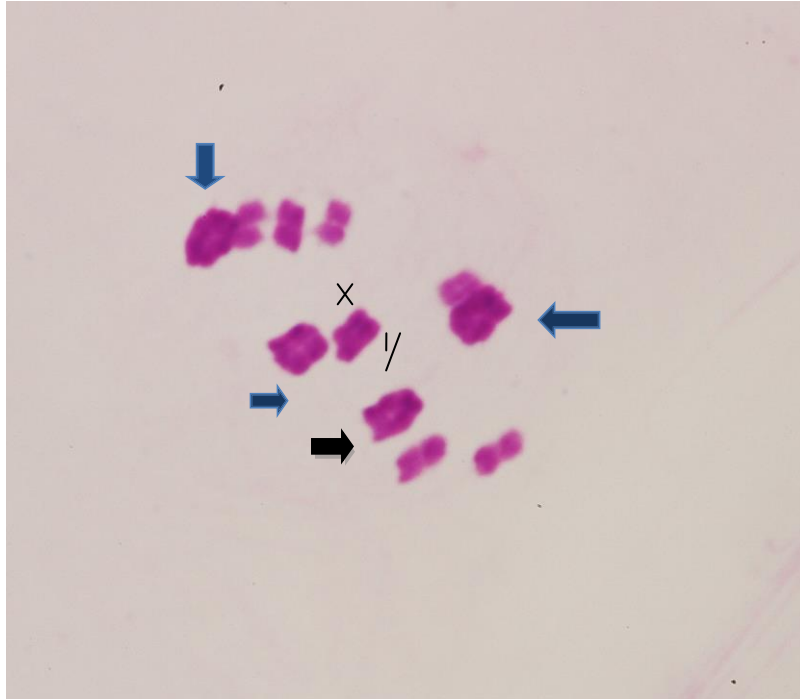


Figura 12.a) Individuo 8185, las flechas azules indican las asociaciones de la forma BB, la flecha negra indica la asociación de la forma AB.

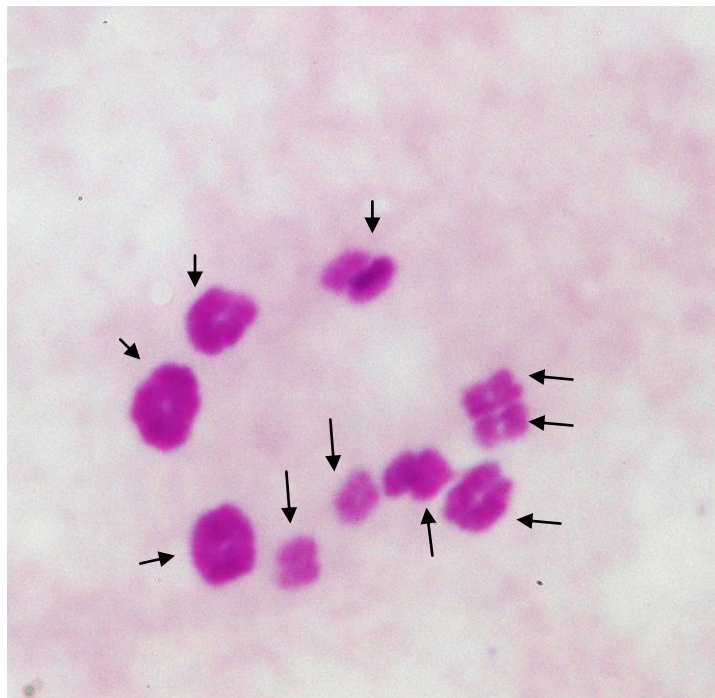


Figura 12.b) Las flechas indican los pares cromosómicos.

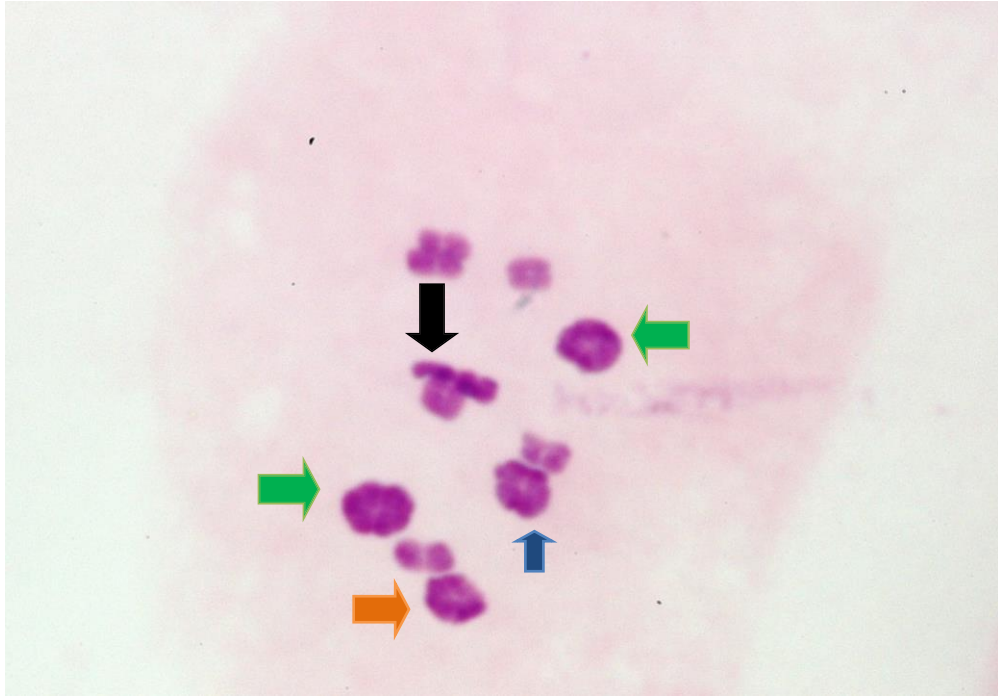


Figura 12.c) Las flechas verdes indican las asociaciones de la forma BB, la flecha azul indica la asociación de la forma AA, la flecha naranja indica la asociación de la forma AB, la flecha negra indica la ubicación de los cromosomas sexuales.

Población Santa Rita de Sigüas:



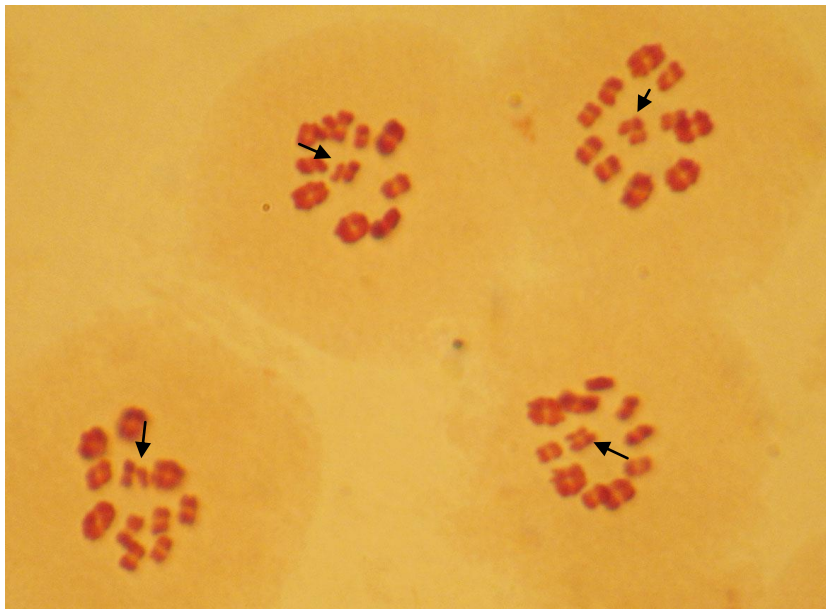
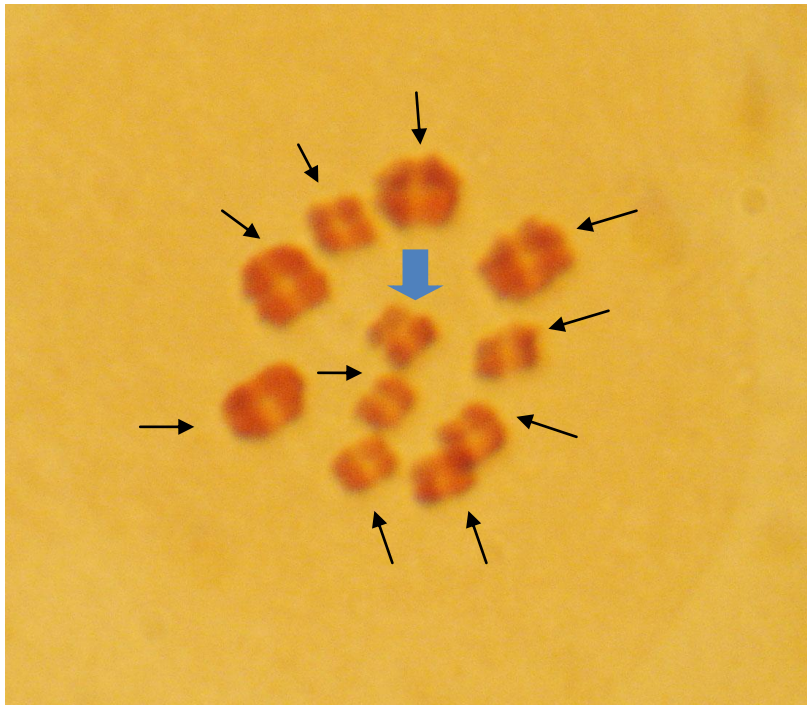


Figura 13.-Placa metafásica, las fechas indican los pares cromosómicos y ubicación central de los cromosomas sexuales (flecha azul).

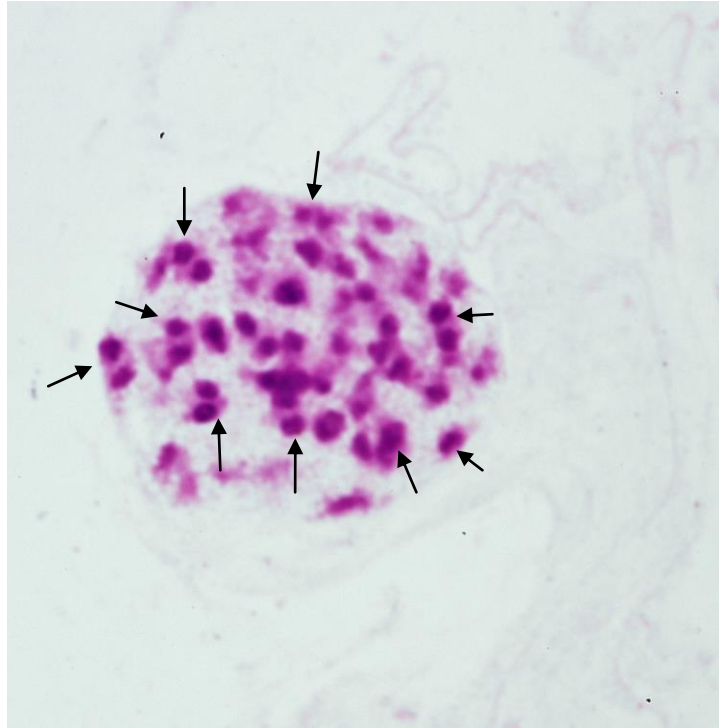


Figura 14.- Celula poliploide.

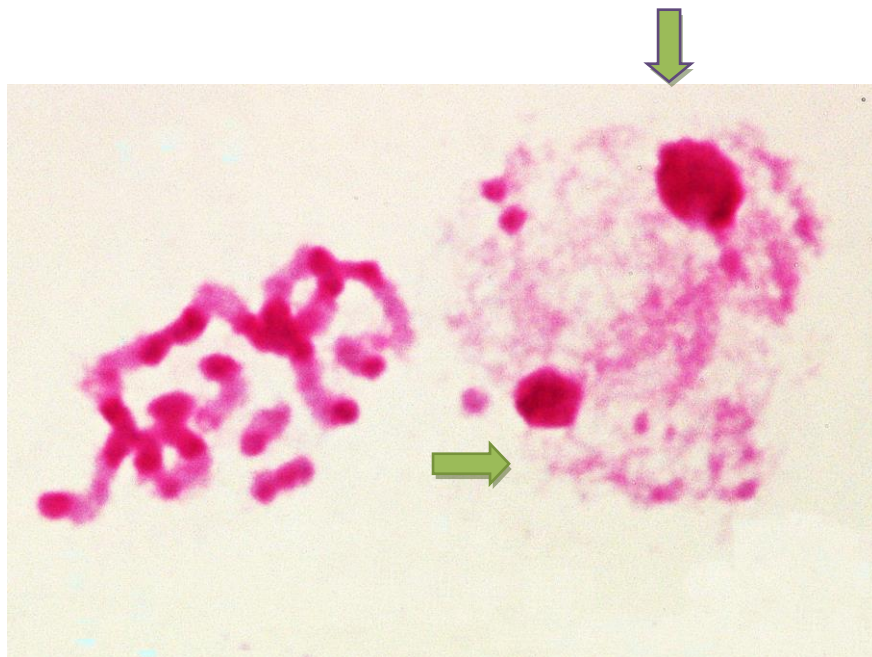


Figura 15.- Las flechas indican la formación del cromocentro característico.

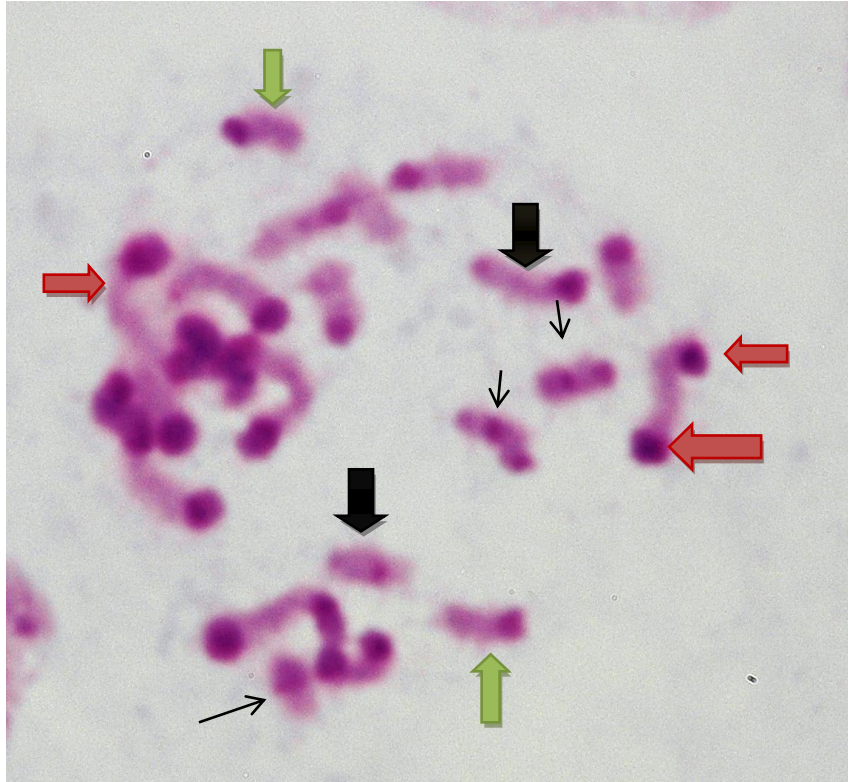


Figura 16.a) Variantes en las bandas heterocromáticas, flecha verde variante A1, flecha negra, variante A2, flechas rojas variante B1, flechas simples, bandas intersticiales.

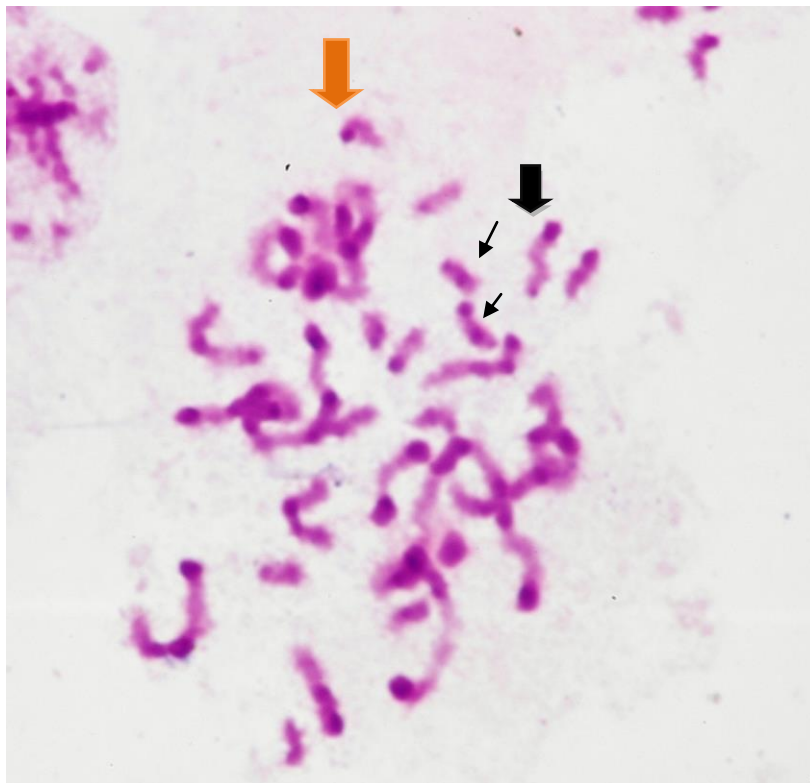




Figura 16.b) Flecha naranja variante A1, flecha negra variante A3, flechas simples, banda intersticial.

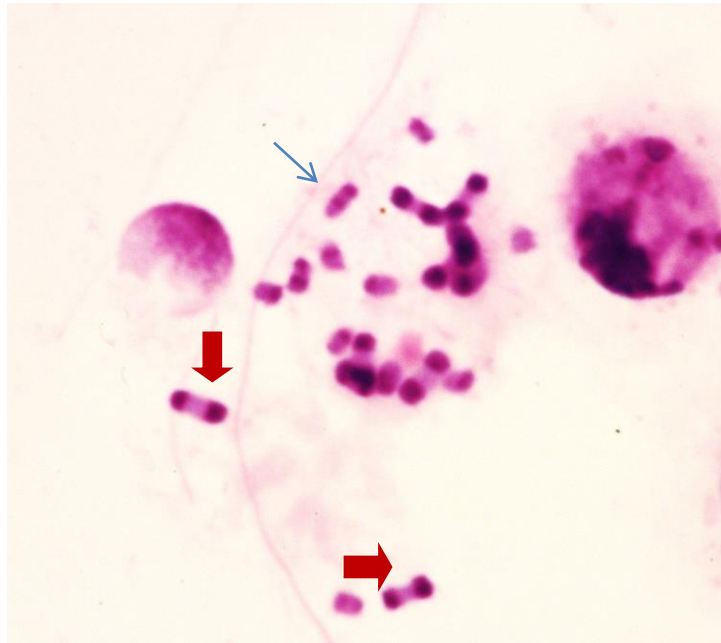


Figura 16.c) Las flechas rojas señalan cromosomas de tipo B.



Figura 17.- La flecha indica los cromosomas sexuales altamente heterocromáticos por lo que podemos indicar que son “C” positivos.

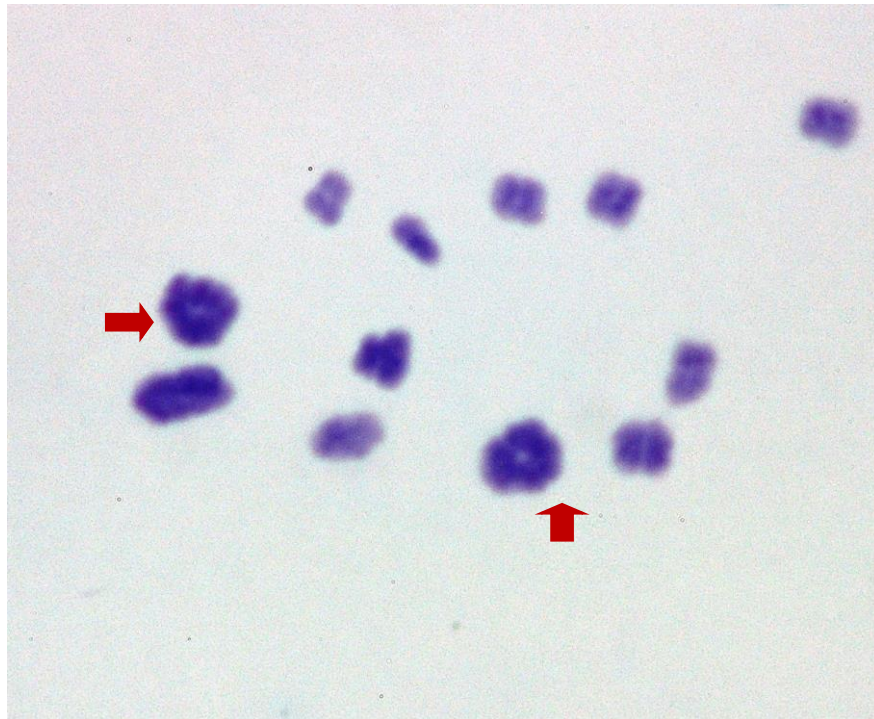


Figura 18.- Individuo 8160, las flechas indican las asociaciones de la forma BB.

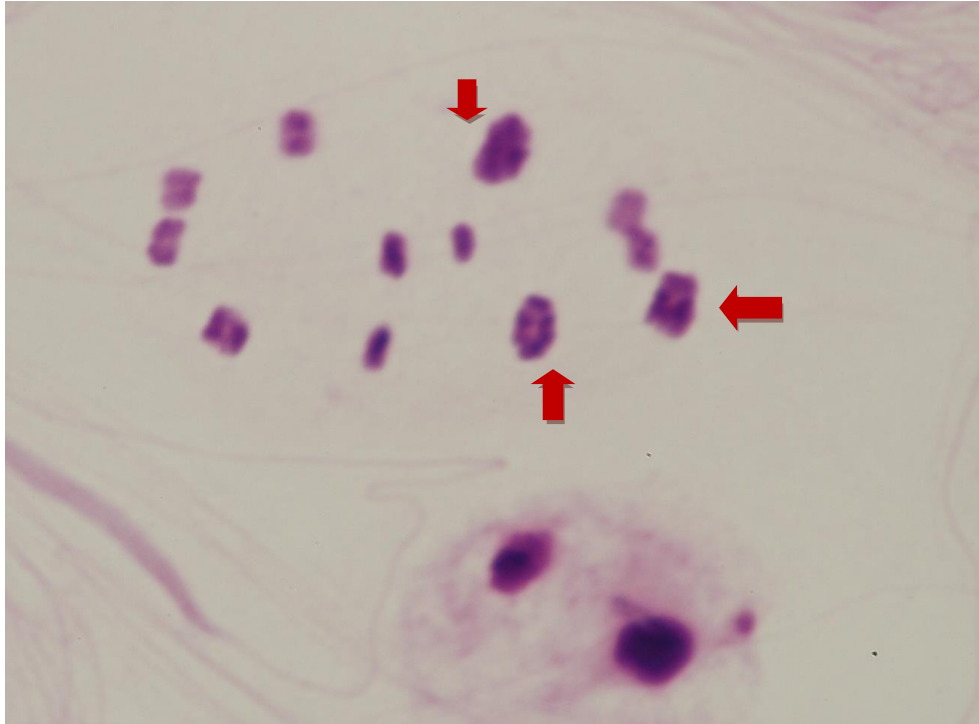


Figura 19.a) Individuo 8161, las flechas indican las asociaciones de la forma BB.

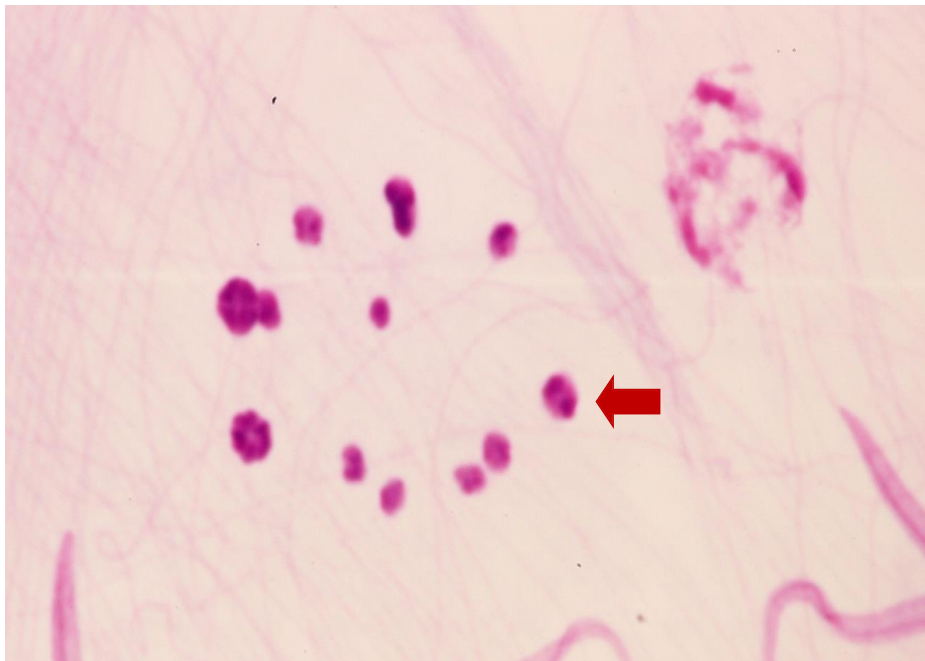


Figura 19.b) La flecha indica la asociación de tipo AA.

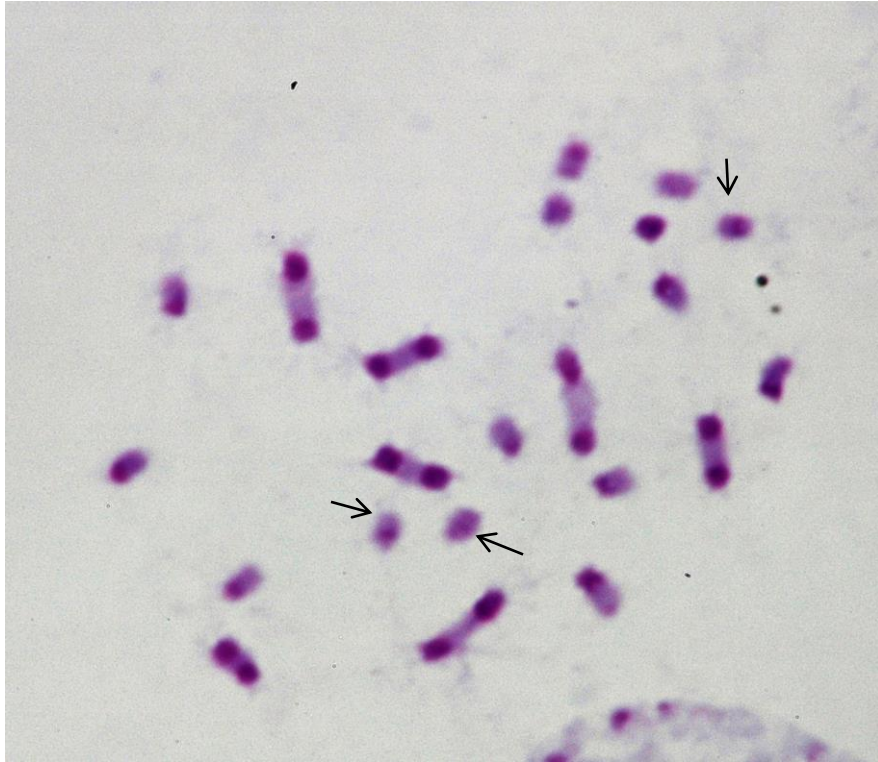


Figura 20.a) Individuo 8162, las flechas indican las bandas intersticiales.



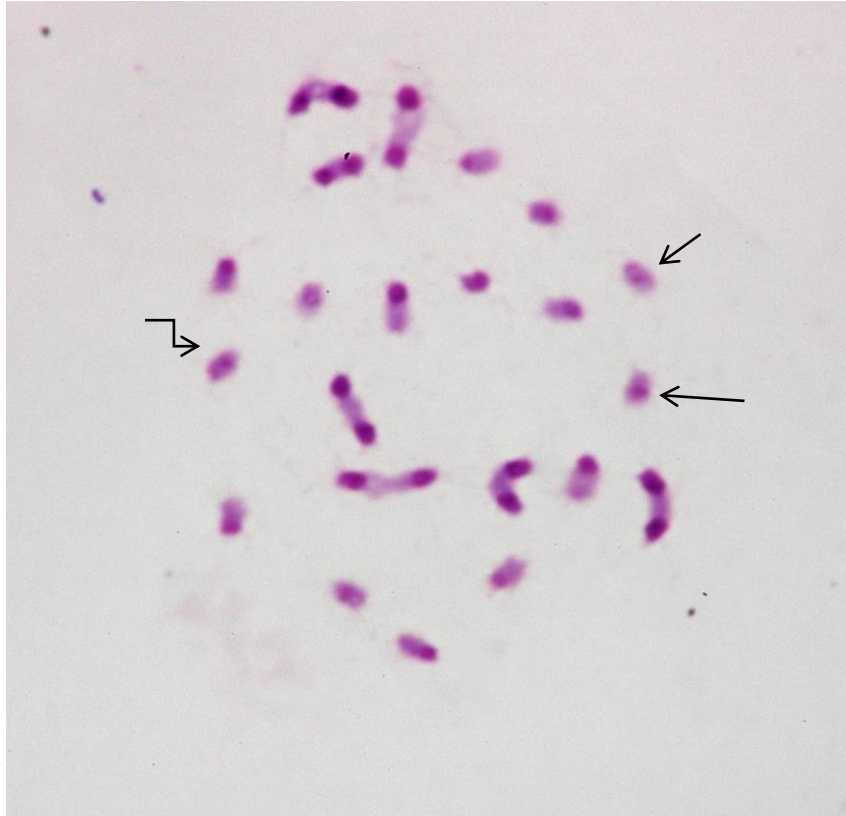


Figura 20.b) Las flechas indican las bandas intersticiales

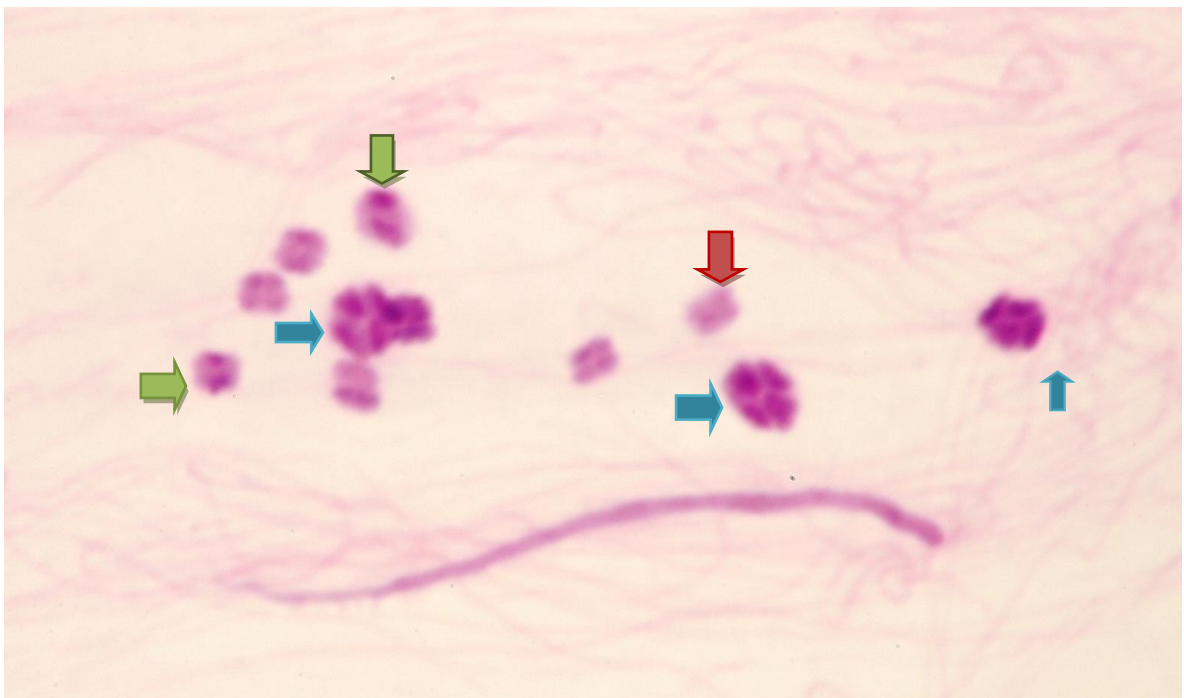


Figura 20.c) Las flechas celestes indican las asociaciones de la forma BB, las flechas verdes indican las asociaciones de tipo AA, la flecha roja indica la asociación de tipo AC.



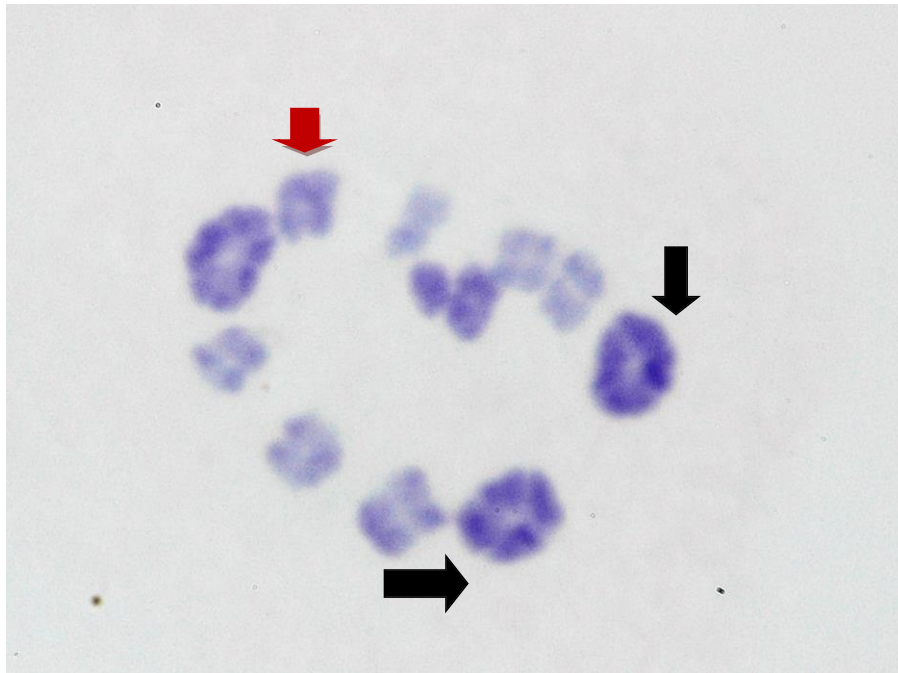


Figura 21.a) Individuo 8169, las flechas negras indican las asociaciones de la forma BB, la flecha roja indica la asociación de la forma AB.

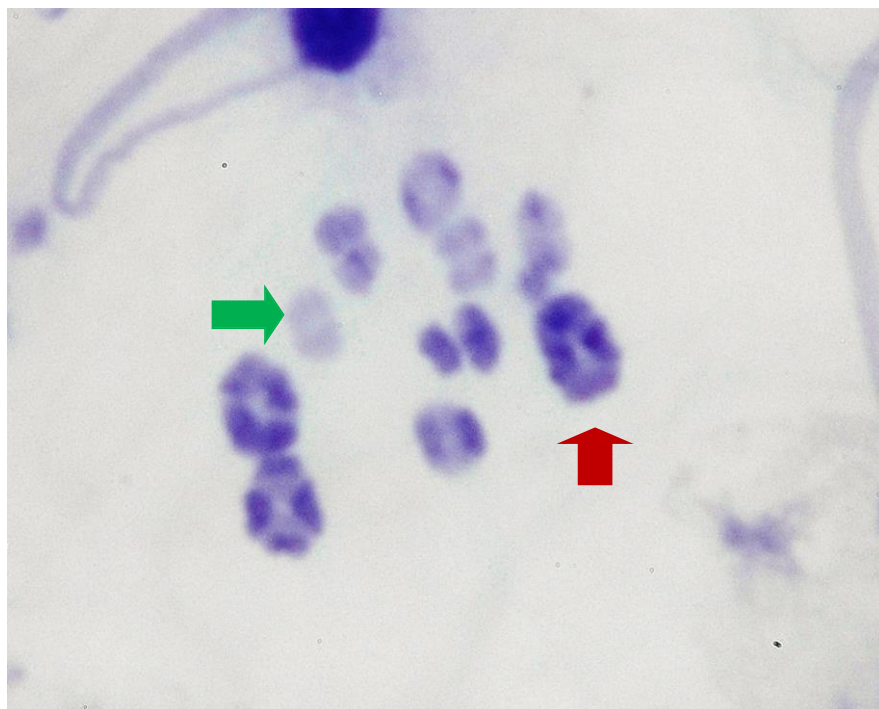


Figura 21.b) La flecha roja indica la asociación de la forma AB, la flecha verde indica la asociación de la forma CC.

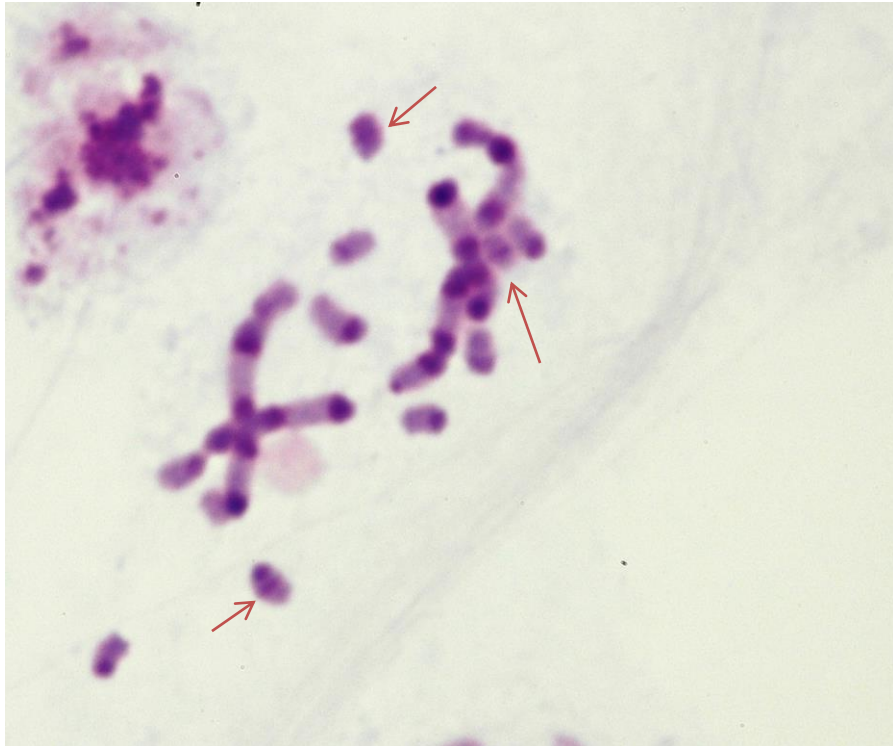


Figura 22.a) Individuo 8170, las flechas indican las bandas intersticiales.

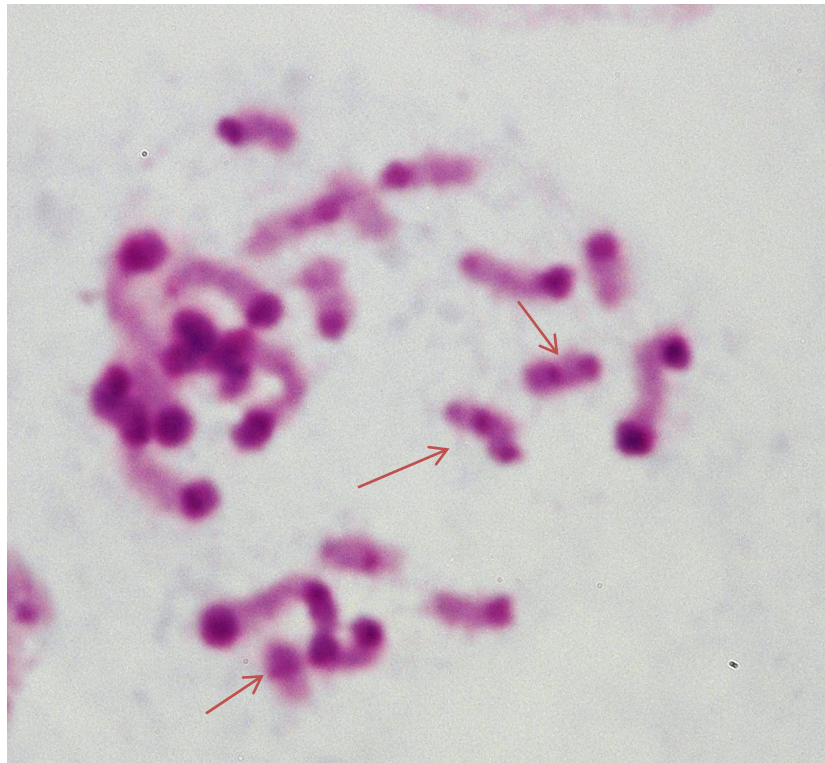


Figura 22.b) Las flechas indican las bandas intersticiales.

## X. ADENDA

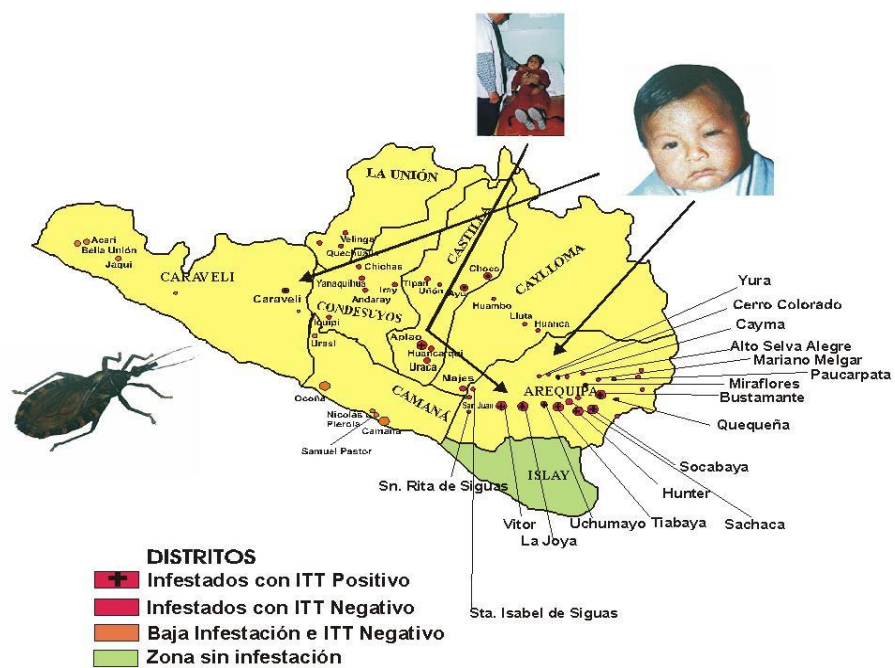


Figura 1. Mapa de Riesgo de la Enfermedad de Chagas en la Región Arequipa

Asis de la Estrategia de Prevención y Control de Enfermedades Metaxénicas año 2008



Figura 2.- Ciclo biológico de *Triatoma infestans*

Asis de la Estrategia de Prevención y Control de Enfermedades Metaxénicas año 2008

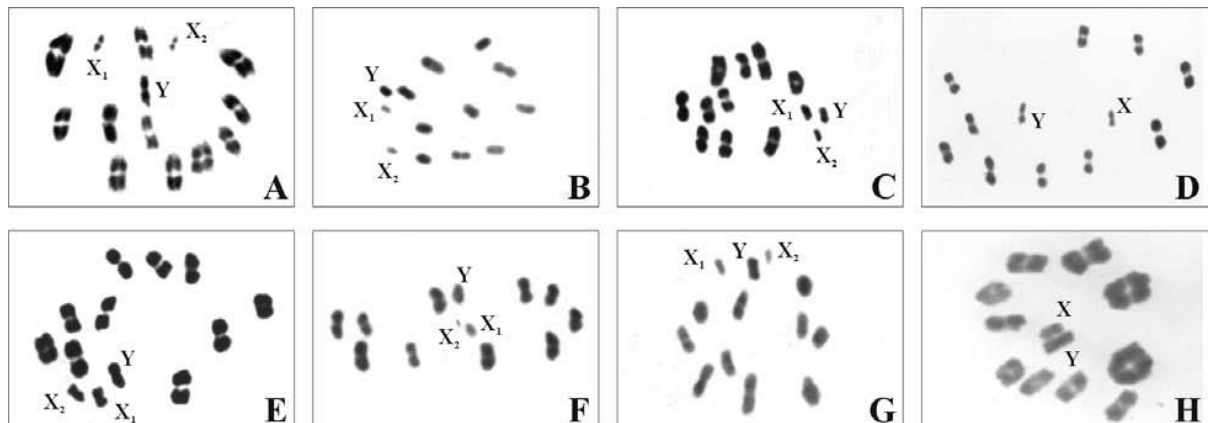


Figura 3.- Mecanismos de determinación sexual en los triatominos. A) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *T. rubrofasciata*. B) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *B. herreri*. C) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *T. dimidiata*. D) XY *T. klugii*. E) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *E. mucrunatus*. F) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *T. barberi*. G) X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y *T. flavida*. H) XY *T. infestans*

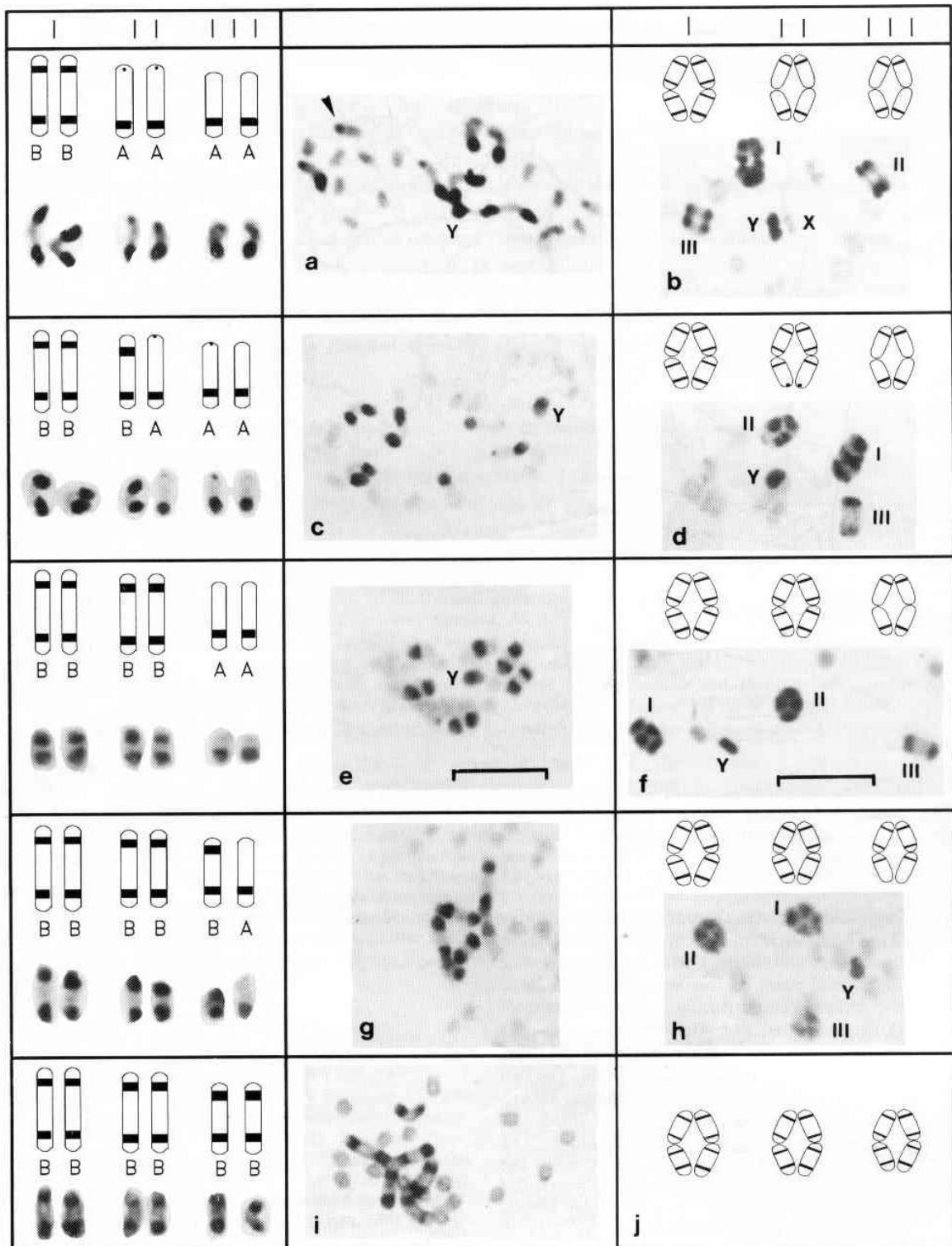




Figura 4.- Variaciones de heterocromatina manifestado en el tamaño de bandas en poblaciones naturales de *T. infestans* en Uruguay.

Heterocromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Genome.35: 1068-1074

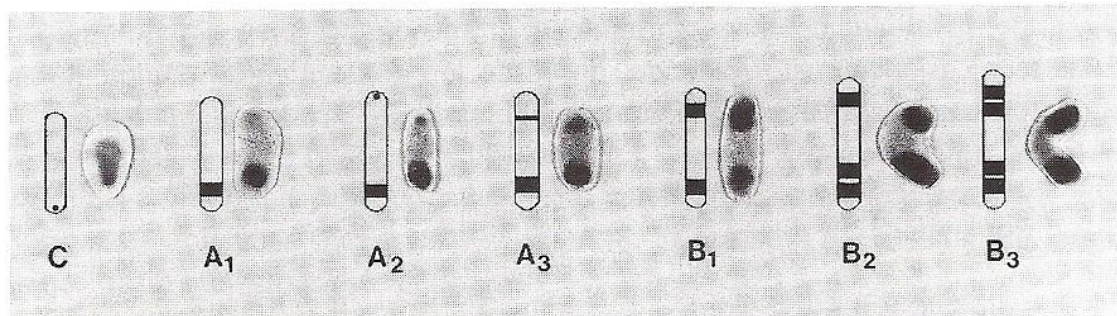


Figura 5.-Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la distribución de los bloques heterocromáticos a lo largo de los cromosomas tipos A, B y C y sus respectivas variantes.

Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Academie Royale des Sciences D'outre-mer.Memoire in-8<sup>o</sup>, Nouvelle Série, Tome 25,fas.3.

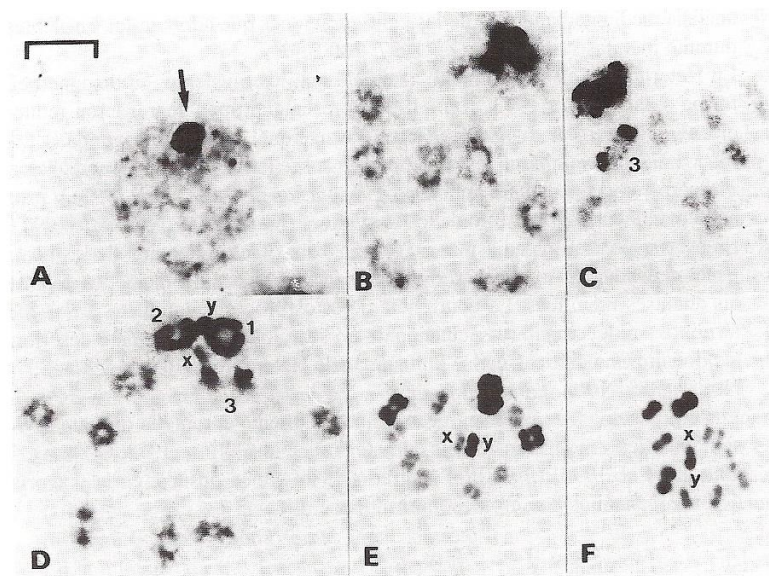


Figura 6.-Meiosis del macho de *Triatoma infestans* de poblaciones de Uruguay.

Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Academie Royale des Sciences D'outre-mer.Memoire in-8<sup>o</sup>, Nouvelle Série, Tome 25,fas.3.

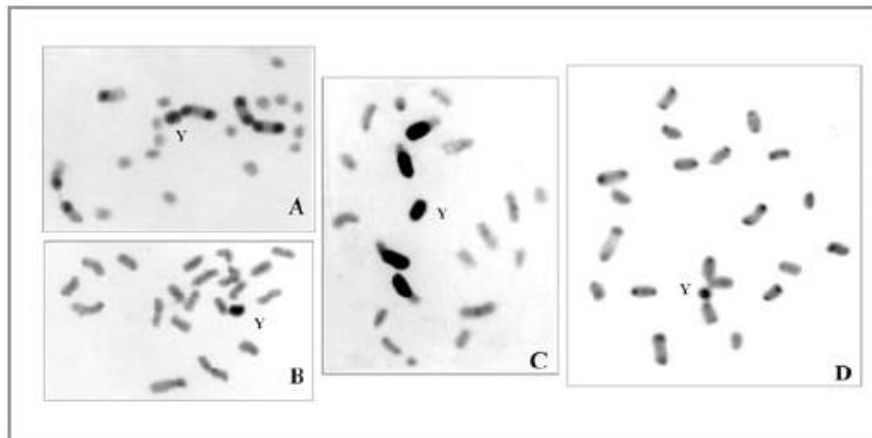


Figura 7.-Prometafases mitóticas goniales de machos de distintas especies de la subfamilia Triatominae. A) *T. infestans*, grupo no-andino. B) *T. klugii*. C) *T. nitida* D) *T. brasiliensis*

Cambios Genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma infestans*. Libro Triatominos de Bolivia y la enfermedad de chagas. Cap VI: 80-10

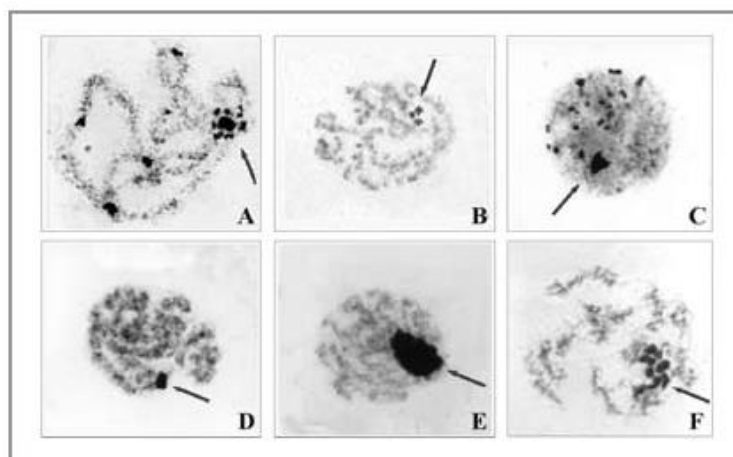


Figura 8.-Comportamiento diferencial de las regiones heterocromáticas durante la profase meiótica I del macho .A) *M. spinolai*. B) *T. dimidiata*. C) *T. patagónica*. D) *T. guasayana*. E) F) *T. nitida*.

Cambios Genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma Infestans*. Libro Triatominos de Bolivia y la enfermedad de chagas. Cap VI: 80-104

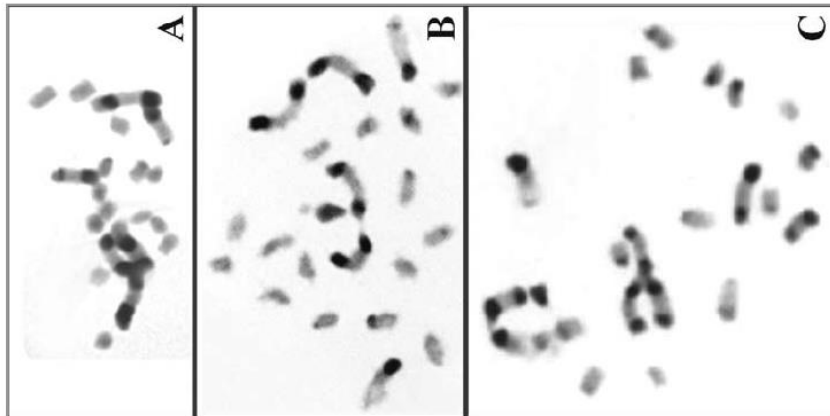


Figura 9.-Grupos cromosómicos en *Triatoma infestans*.A) grupo no-andino. B) Grupo Intermedio. C) Grupo andino.

Cambios Genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma infestans*. Libro Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Cap VI: 80-104



Figura 10.- Dispersión de *Triatoma infestans*- Hipótesis Adaptativa. Flechas rojas, origen del grupo cromosómico andino y su dispersión. Flechas amarilla, origen del grupo no-andino y su dispersión. En azul se muestra la localización geográfica del grupo intermedio. (Panzera et al. 2007).



Cambios Genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma infestans*. Libro Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Cap VI: 80-104

## **Heterocromatina**

Heitz, (1928; 1929) acuñó el término heterocromatina para referirse a aquellas regiones de los núcleos, en interfase, que muestran un mayor grado de condensación y un incremento en la tinción (Citado en Frías, L.D. 2004).

La heterocromatina es el material genético que no transcribe, o transcribe tardíamente, la variabilidad e inactividad de estas regiones heterocromáticas no indica necesariamente una ausencia de función o efecto de dichas regiones sobre el organismo.

En los eucariontes existe una gran cantidad de heterocromatina que replica y se conserva a través de las generaciones, lo que sugiere que existe un control genético para su mantenimiento y también para alterar su redundancia sin modificar el funcionamiento celular y organístico (Scott y Craig, 1989) (Citado en Frías, L.D.2004).

### **La Heterocromatina Constitutiva**

La heterocromatina constitutiva corresponde a un material cromatínico presente en ambos miembros de un par de cromosomas homólogos. En la mayor parte de los casos se localiza en la región próxima al centrómero o bien en los telómeros. La heterocromatina constitutiva ha sido utilizada corrientemente como un marcador para identificar especies (Burns, 1966) o bien para determinar los cambios cromosómicos durante el proceso evolutivo de determinados taxa tales como fusiones céntricas, inversiones pericéntricas, o translocaciones (Cardoso y col. 1974). En diferentes especies de animales y plantas se ha demostrado que los pares de cromosomas homólogos pueden diferir en número y localización de bandas heterocromáticas (diferencias cualitativas) y en la cantidad de

heterocromatina en una región específica (variación cuantitativa) (Smith, 1952; J.A. Burns, 1,966; Hsu y Arrighi, 1971; J. D. Murray y R. M. Kitchin, 1976; Giraldez y col, 1979) (Citado en Frías, L.D.2004).

En algunos grupos de insectos se ha descrito que los patrones heterocromáticos son una característica distintiva de cada especie, en complejos de especies crípticas del género *Batrocera* (Diptera:Tephritidae) (Bamai, 1,998;Bamai y col., 1,999;Bamai y col.,2000) y también en especies de la subfamilia Triatominae (Hemiptera:Reduvidae) (Panzera et al 1992;Panzera et al, 1995).(Citado en Frías, L.D.2004).

El rol de la heterocromatina como agente facilitador de los rearrreglos cromosómicos han sido muy poco considerados. Según Goldschmidt, (1,949b), lo que facilitaría estos rearrreglos es que determinadas secciones heterocromáticas se caracterizan por presentar una asociación inespecífica y pueden unirse con otras regiones de sus propios o diferentes cromosomas, lo que induciría a rearrreglos cromosómicos constituyéndose en un factor importante en el proceso evolutivo. Las mutaciones que inducirían estos cambios han sido acuñadas por R. Goldschmidt (1,940) como mutaciones sistémicas. (Citado en Frías, L.D.2004).